

Endura Electroporation-Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: DE1048)

Endura Electroporation-Competent Cell	50 μ l /支
pUC19 (control vector, 10pg/ μ l)	10 μ l
保存条件 (保质期):	-80 $^{\circ}$ C (6个月)

● 基因型

*recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 (Str^R) xyl-5 λ /leu mtl-1 F- mcrB mrr hsdS20(*r_B*⁻, *m_E*⁻)*

● 产品说明

Endura 电击感受态细胞只能用于电击转化, 不能用于热激转化, 具有与 Stbl3 菌株类似的基因型, 是慢病毒载体系统推荐使用的菌株。基因组含有重组酶 *recA13* 突变, 可有效抑制长片段末端重复区的重组, 降低错误重组的概率。Endura 菌株具有链霉素抗性, 不存在 *lacI^qZAM15*, 不可用于蓝、白斑筛选。此外在 Endura 基因组中 *mrr*、*hsdS20*、*mcrB* 几个基因位点被突变, 可提高转化效率。Endura 电转感受态细胞经特殊工艺制作, pUC19 质粒 (2686bp, Amp^R) 检测转化效率 $>1 \times 10^{10}$ cfu/ μ g DNA。

● 操作方法

1. 取适量 SOC 放 37 度预热 1-2 小时 (每管感受态准备 10ml SOC)。
2. 0.1 cm 电击杯和杯盖从储存液中拿出倒置于干净的吸水纸上 5 分钟沥干水分, 正置 5 分钟, 待乙醇挥发干净立即插入冰中, 压实冰面, 电击杯顶离冰面 0.5 cm 以方便盖上杯盖, 冰中静置 5 分钟充分降温。
3. 取 -80 $^{\circ}$ C 保存的 Endura 电击感受态细胞插入冰中 5 分钟, 待其融化, 加入目的 DNA (质粒或连接产物) 并用手拨打 EP 管底轻轻混匀, 避免产生气泡, 立即插入冰中。
 - A. 测定转化效率使用 1 μ l 10 pg/ μ l 的对照质粒 pUC19;
 - B. 对于连接产物, 部分公司的 T4 连接酶体系或重组体系可与电击感受态混合后电击转化, 无需进行 DNA 纯化, 但 DNA 浓度不能过高, DNA 浓度不超过 100 ng/ μ l, 体积不超过 5 μ l/50 μ l 感受态。
 - C. 对离子浓度较高的 DNA 溶液或反应体系请用膜纯化或乙醇沉淀法纯化 DNA, ddH₂O 溶解后电击转化。
4. 用 200 μ l 枪头(用刀切除 0.5cm 枪尖)将感受态-DNA 混合物快速移到电击杯中 (避免产生气泡), 轻轻晃动使液面保持水平状态, 盖上杯盖, 插入冰中。
5. 启动电转仪, 设置参数: C=25 μ F, PC=200 Ω , V=1.8 kV, 将电击杯从冰中拿出, 用吸水纸擦拭表面, 吸干表面水渍, 放入电转槽中, 电击完成后拿出电转杯放室温, 打开杯盖, 15 秒内加入 0.9ml 预热的 SOC (此步骤可在电转仪旁操作, 无需在超净台操作), 用 1ml 枪头吹电击杯底部 2-3 次, 混匀后转移到 50 ml 离心管 (BD Falcon 50 ml 离心管等), 向离心管中补加 S.O.C. 培养基至 10 ml。37 $^{\circ}$ C, 225 rpm 复苏 60 分钟。
6. 5000 rpm 离心一分钟收菌, 重悬后取 100-200 μ l 涂布到含相应抗生素的 S.O.C 平板上 (因菌量较大, 若全部涂板请选用直径 15cm 培养皿 2-5 个)。将平板倒置放于 37 $^{\circ}$ C 培养箱过夜培养 15-24 小时。
7. 若要获得大量, 高纯度质粒, 建议在 TB 培养基 (唯地 CAT#: CM1018L) 中 37 度摇菌培养 (以标准质粒 PUC19 为例: 在 TB 营养液中过夜培养的菌体浓度和质粒产量为 LB 的 3-4 倍, SOC 的 2-3 倍)

● Endura 菌株使用常见问题

1. 在使用 Endura 感受态时怎样提高病毒质粒的产量?

答: 为了提高 Endura 菌株中的病毒质粒产量, 可采用以下方法:

- 使用质粒提取溶液 I, II, III 提取质粒时, 确保溶液 I 中含有 10mM 的 EDTA (EDTA 可使 endA1 失活), 并且用酚/氯仿/异戊醇溶液多抽提几次, 尽量去除残留的 endA1。
- 接菌时用新鲜的菌斑, 不要使用 4°C 保存的菌落接菌, 摇菌时用大体积容器, 300 rpm, 增加溶氧量。
例如: 小提质粒时, 50 ml 离心管中接入 6 ml LB 菌液, 羧苄青霉素 50 µg/ml, 接新鲜克隆, 37°C, 300 rpm 摇菌 20 小时; 大提质粒时, 2L 离心瓶中接入 200ml LB 菌液, 羧苄青霉素 50 µg/ml, 接新鲜克隆, 37°C, 300 rpm 摇菌 20 小时。
- 对不稳定的克隆或病毒质粒优先以质粒状态保存, 尽量避免将质粒保存在大肠杆菌细胞中。对摇好的菌液应立即提取质粒, 不可将菌液在室温或低温放置一段时间后提取质粒。
- 用 TB 培养基 (唯地 CAT#: CM1018L) 摇菌 (以标准质粒 PUC19 为例: 在 TB 中过夜培养的菌体浓度和质粒产量为 LB 的 3-4 倍, SOC 的 2 倍)。

2. 可以用 TOP10 或 DH5α 代替 Endura 或 Stable 扩繁病毒质粒吗?

答: 可以代替, Endura 菌株和 Stable 菌株在病毒构建和扩繁过程中具有很低的错误重组概率, 我们推荐在试验中优先使用。普通大肠杆菌如 TOP10 或 DH5α 也可以扩繁病毒质粒, 只是产量要低一些, 并且在扩繁过程中容易产生错误重组, 导致一些必要元件的删除, 当使用 TOP10 或 DH5α 时, 最好在 30°C 摇菌, 采用低盐浓度的 LB 溶液 (5 g/L 氯化钠) 以降低错误重组的概率。

3. 在使用 Endura 或 TOP10 感受态细胞构建或扩繁病毒质粒时, 经常会看到在平板上长出偏小或偏大的克隆, 我应该选择哪种克隆进行后续实验?

答: 我们推荐挑选直径偏小的克隆进行后续实验, Endura 和 TOP10 菌株在构建或扩繁病毒质粒过程中都有可能产生末端重复区的错误重组 (Endura 菌株错误重组率约为 30%; TOP10 菌株错误重组率约为 70%), 发生错误重组的病毒质粒赋予该克隆生长速度加快的优势, 因而产生直径偏大的克隆。

4. Endura 平板过夜培养菌落很小, 并且小摇时摇菌很长时间菌液依然很淡, 这种情况怎么解决?

答: 这是正常结果, 与 DH5α 或 TOP10 这种常用克隆菌株相比, Endura 生长速度确实很慢, 所以平板在 37 度时需要 15-18h, 在 30 度需要 24h。Stable 菌株对融氧要求较高, 小摇时应增大液面面积与液面高度的比值, 这样才能在摇菌时使液面产生起伏波动, 增加融氧, 加快菌株生长。

● 注意事项

- 对不稳定 DNA 片段的克隆或逆转录病毒/慢病毒载体的构建, 涂板后可在 30°C 培养, 以减少发生错误重组的概率。
- 加入 DNA 时体积不应大于感受态体积的 1/10, 电击感受态细胞加入电击杯应避免产生气泡。
- 当 DNA 不纯或存在盐, 乙醇, 蛋白及缓冲液等污染时, 转化效率急剧下降。
- 推荐使用高纯质粒提取试剂盒提取质粒。质粒增大一倍, 转化效率下降一个数量级。
- 对于连接产物, 最好用膜纯化或乙醇沉淀法纯化 DNA 后用适量 ddH₂O 或 TE 缓冲液 (10 mM Tris HCl, pH7.5; 1 mM EDTA) 重悬产物。