

ET12567 (pUZ8002) Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: DL3070)

ET12567 (pUZ8002) Competent Cell	100 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

F- dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdR zjj-202::Tn10 recF143 galK2 galT22 ara-14 lacY1 xyl-5 leuB6 thi-1 tonA31 rpsL136 hisG4 tsx-78 mtl-1 glnV44 (pUZ8002 Tet^R)

● 产品说明

ET12567 (pUZ8002)菌株来源于 GM2929 菌株, 是甲基转移酶 *dam*、*dcm* 缺陷菌株, 主要用于链霉菌的转基因操作。ET12567 (pUZ8002)利用接合转移的方法将链霉菌基因编辑相关质粒 pSET152、pKC1139 等导入链霉菌中, 可以对链霉菌基因进行敲除或过表达等各种转基因操作。大部分链霉菌拥有“甲基化敏感限制系统”, 是甲基化敏感受体菌, 能够通过甲基修饰系统区分出自身 DNA 和外来 DNA。普通大肠杆菌 (如 DH5 α), 其细胞中的质粒会被自身的 *Dam* 和 *Dem* 甲基化酶修饰, 打上“大肠杆菌印记”, 一旦链霉菌检测到带有这种“印记”的外来 DNA, 其限制系统就会启动, 将其切割并降解, 导致这类质粒转化或接合转移效率极低; 所以需要转入到链霉菌中的质粒不被甲基化, ET12567(pUZ8002)菌株的两个甲基转移酶被突变, 提取的质粒不会被甲基化标记, 同时 pUZ8002 质粒含有 *tra* 基因, 能够编码转移蛋白 *Tra*, 可以通过接合转移的方法将链霉菌编辑相关质粒高效导入链霉菌细胞内, 完成链霉菌的转基因操作。ET12567 (pUZ8002)菌株的 *hsdM hsdR* 突变废除自身限制系统, 确保不会降解外源质粒, 能接受来自其他菌株的 DNA; 转座子 *Tn9* 插入 *dam* 基因产生 *dam* 突变的同时赋予 ET12567 菌株氯霉素抗性; 接合转移辅助质粒 pUZ8002 携带四环素抗性基因和卡那霉素抗性基因。ET12567(pUZ8002)在培养过程中需加入 25 μ g/ml 氯霉素和 25 μ g/ml 卡那霉素, 有助于维持细胞内的 *dam* 突变和 pUZ8002 质粒存在。唯地生物生产的 ET12567 (pUZ8002)感受态细胞经特殊工艺制作, pUC19 质粒 (2686bp, Amp^R) 检测转化效率 $>1 \times 10^8$ cfu/ μ g DNA。

● 操作方法

1. ET12567 (pUZ8002)感受态细胞从 -80 $^{\circ}$ C 拿出, 迅速插入冰中, 5 分钟后待菌块融化, 加入目的质粒并用手拨打 EP 管底轻轻混匀 (避免用枪吸打), 冰中静置 25 分钟。
2. 42 $^{\circ}$ C 水浴热激 45 秒, 迅速放回冰中并静置 2 分钟, 晃动会降低转化效率。
3. 向离心管中加入 0.9 mL 室温 S.O.C. 或 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C, 200 rpm 复苏 60 分钟。
4. 5000 rpm 离心 1 分钟收菌, 留取 100 μ l 左右上清吹打重悬菌块并涂布到含相应抗生素的 LB 平板。
5. 将平板倒置放于 37 $^{\circ}$ C 培养箱过夜培养。

● 注意事项

1. 感受态细胞最好在冰中融化。插入冰中 8 分钟内加入目标 DNA, 不可在冰中放置时间过长, 长时间存放会降低转化效率。
2. 转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。