



ClearColi K12 电转感受态细胞

ClearColi K12 Electroporation Chemically Competent Cell

Cat.NO. ZC1042D

目录编号	产品名称	包装单位
<input type="checkbox"/> ZC1042D-1	ClearColi K12 电转感受态细胞	5×50μl
<input type="checkbox"/> ZC1042D-2	ClearColi K12 电转感受态细胞	20×50μl

备注: 以上包装均含有 Compcell Control Plasmid pUC19(0.1ng/μl)5μl (质量控制用)。
储存: -70°C 保存六个月。

产品介绍:

ClearColi K12 电击感受态细胞只能用于电击转化, 不能用于热激转化。ClearColi K12 菌株来源于 K12 endA- recA- 菌株。在 K12 endA- recA- 菌株中引入突变, 导致 ClearColi K12 细胞壁外层的脂多糖 (LPS) 被修饰:LPS 的低聚糖链被删除, 同时 LPS 的两个酰基链也被删除, 进而破坏了 ClearColi K12 大肠杆菌的内毒素信号通路, 使得从该细胞中提取的蛋白或质粒 DNA 中的内毒素含量极低, 提取的无内毒素质粒广泛应用于后续的哺乳动物细胞转化。ClearColi K12 同时缺失核酸内切酶 (endA) 和重组酶 (recA), 提高了质粒 DNA 的产量和质量。ClearColi K12 电击感受态细胞经特殊工艺制作, pUC19 质粒检测转化效率可达 1×10^7 cfu/μg DNA。

基因型为: Fλ⁻ Δ endA⁻ Δ recA⁻ frt181 msbA52 Δ gutQ Δ kdsD Δ lpxL Δ lpxM Δ pagP Δ lpxP Δ eptA

操作方法:

1. 0.1cm 电击杯和杯盖从储存液中拿出倒置于干净的吸水纸上 5min, 待其沥干水分, 正置 5min, 使乙醇充分挥发, 待乙醇挥发干净立即插入冰中, 压实冰面, 电极杯顶离冰面 0.5cm 以方便盖上杯盖, 冰中静置 5min 充分降温。

2. 取 -70°C 保存的电击感受态细胞插入冰中 5min, 待其融化, 加入目的 DNA (质粒或连接产物) 并用手拨打离心管底轻轻混匀, 避免产生气泡, 立即插入冰中。

A. 测定转化效率使用 1μl 0.1ng/μl 的对照质粒 pUC19;

B. 对于连接产物, 请用乙醇沉淀 DNA 后加入适量 TE 缓冲液 (10mM Tris-HCl, pH7.5; 1mM EDTA) 重悬, DNA 浓度不超过 100ng/μl, 体积不超过 5μl/50μl 感受态。

3. 用 200μl 枪头将感受态-DNA 混合物快速移到电击杯中, 避免产生气泡, 盖上杯盖。

4. 启动电转仪, 设置参数: C=25μF, PC=200Ω, V=1.8kV (BioRad 电转仪推荐参数); 或 C=25μF, PC=200Ω, V=2.4kV (BTX ECM 630 或 Bio-Rad GenePulsar 电转仪推荐参数); 也可按所用电转仪推荐的参数操作。将电击杯快速放入电转槽中, 电击完成快速插入冰中。

5. 2min 后从冰中取出电击杯, 放室温, 加入 700μl 不含抗生素的无菌 S.O.C. 培养基 (室温), 用 1ml 枪吹吸电击杯底部数次混匀后, 转移到 50ml 离心管 (BD Falcon 50ml 锥形离心管等), 向离心管中补加 S.O.C. 培养基至 5ml。37°C, 225rpm 复苏 60min。



6. 5000rpm 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 LB(务必使用高盐培养基平板, 不可用 2YT, SOB, SOC 等低盐培养基)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 培养箱中培养 36-48 小时(培养 24 小时后可看到很小的克隆)。

注意事项:

1. 因 ClearColi K12 细胞壁外层的脂多糖(LPS)被修饰, 细胞易死亡, 不易保存, 平板菌在 4 $^{\circ}$ C 存放时间应不超过 1 周。且适合在高盐培养基中生长。
2. ClearColi K12 电击感受态效率很低, 不适用于构建质粒使用, 一般用来扩繁质粒, 提取高质量的无内毒素的质粒; 若构建质粒, 请选用 DH5a、TOP10 等转化效率较高的感受态细胞。
3. ClearColi K12 菌株生长缓慢, 平板在 37 $^{\circ}$ C 培养时间在 36-48 小时之间。
4. 加入 DNA 时体积不应大于感受态体积的 1/10。
5. 电击感受态细胞加入电击杯应避免产生气泡, 气泡会增加弧光放电风险。
6. 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。
7. 电击杯里的离子可增加溶液的电导增大在含有细胞和 DNA 的溶液产生电流和弧光放电的风险。
8. 若转化大质粒或想获得较高转化效率, 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。
9. 对于连接产物转化, 最好转化前乙醇沉淀 DNA 后用适量 TE 缓冲液 (10 mM Tris HCl, pH7.5; 1 mM EDTA) 重悬产物, 保证 DNA 浓度不超过 100ng/ μ l。过高浓度连接产物或过大体积连接产物会降低转化效率, 增加弧光放电的风险。
10. ClearColi K12 菌株的细胞壁被修饰过, 细胞比较脆弱, 混入质粒时应轻柔操作, 吸取感受态细胞时避免用力过猛, 以免剪切力过大损伤细胞膜, 降低转化效率。转化高浓度的质粒或连接产物可相应减少用于涂板的菌量。
11. 电击感受态细胞最好保存在 -80 $^{\circ}$ C 以下, 高于 -80 $^{\circ}$ C 超期储存会导致转化效率会下降。