

## ClearColi K12 电转化感受态使用说明

### ◇ 产品简介

本品为大肠杆菌 ClearColi K12 (基因型: F- $\lambda$ - $\Delta$ endA- $\Delta$ recA-*frr181 msbA52*  $\Delta$ gutQ  $\Delta$ kdsD  $\Delta$ lpxL  $\Delta$ lpxM  $\Delta$ pagP  $\Delta$ lpxP  $\Delta$ eptA) 制作的电击感受态细胞, 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*<sup>-</sup> *recA*<sup>-</sup> 菌株。在 K12 *endA*<sup>-</sup> *recA*<sup>-</sup> 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 (2686bp, Amp<sup>R</sup>) 检测转化效率 >1 × 10<sup>7</sup> cfu/μg DNA。

### ◇ 产品规格

| 品名                   | 货号       | 规格       |
|----------------------|----------|----------|
| ClearColi K12 电转化感受态 | EL018H-S | 10×50 μL |
|                      | EL018H-M | 50×50 μL |

-80℃ (12 个月)

### ◇ 转化方法

1. 取适量 LB 放 37 度预热 1-2 小时 (每管感受态准备 10ml LB)。

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℃ 保存的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。

4. 用 200 ul 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, 根据仪器要求设置参数, 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 100ul 预热的 LB (此步骤可在电转仪旁操作, 无需在超净台操作), 用 1ml 枪吹吸电击杯底部 2-3 次, 混匀后转移到 50 ml 离心管, 向离心管中补加 LB 培养基至 10 ml。37℃, 220 rpm 复苏 60 分钟。

6. 5000rpm 离心一分钟收菌, 留取 100-200ul 菌液重悬后涂布到含相应抗生素的平板上。将平板倒置放于 37℃ 培养箱过夜培养 12-16 小时。

### 注意事项

1. 加入 DNA 时体积不应大于感受态体积的 1/10。

2. 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。

3. 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。

4. 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。

5.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。

6.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 ddH<sub>2</sub>O 或 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 100 ng/ul。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。

7. 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最终用于涂板的菌量。

8. 电击感受态细胞最好保存在-80℃以下，高于-80℃超期储存会导致转化效率会下降。