

## Stb14 电转化感受态使用说明

### ◇ 产品简介

本品为大肠杆菌 Stb14 (基因型:  $F'$  *proAB*<sup>+</sup> *lacI*<sub>q</sub> $\Delta$ M15 *Tn10* (Tet<sup>R</sup>)*mcrA*  $\Delta$  (*mcrBC*-*hsdRMS*-*mrr*) *recA1* *endA1* *gyrA96* *gal*-*thi-1* *supE44*  $\lambda$ -*relA1* $\Delta$  (*lac-proAB*)) 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。Stb14 菌株来源于 Stb12 *E. coli* strain, 可用于慢病毒载体或逆转录病毒载体的构建。Stb14 菌株适合克隆不稳定插入片段 (正向重复序列, 逆转录病毒序列等); *mcrA* 突变和 *mcrBC*-*hsdRMS*-*mrr* deletion 使该菌株更适于克隆甲基化的基因组序列。*recA1* 和 *endA1* 的突变有利于克隆 DNA 的稳定和高纯度质粒 DNA 的提取。*lacI*<sub>q</sub> $\Delta$ M15 标记使得 Stb14 菌株可用于蓝白斑筛选, 此菌株具有四环素抗性。特别适合慢病毒质粒文库或逆转录质粒文库的构建。Stb14 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  $>0.5 \times 10^{10}$  cfu/ $\mu$ g DNA。

### ◇ 产品规格

品名	货号	规格
Stb14 电转化感受态	EL009H-S	10 $\times$ 50 $\mu$ L
	EL009H-M	50 $\times$ 50 $\mu$ L

-80 $^{\circ}$ C (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 $^{\circ}$ C 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  $\mu$ 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, 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 100 $\mu$ l 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 $^{\circ}$ C, 220 rpm 复苏 60 分钟。
6. 5000rpm 离心一分钟收菌, 留取 100-200 $\mu$ l 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 $^{\circ}$ C 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 的溶液中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。