

Mach1-T1 电击转化感受态使用说明

产品规格

品名	货号	规格
Mach1-T1 电击转化感受态	EL033-H-S	5×50 μL
	EL033-H-M	10×50 μL

保存条件: -80℃ (12 个月)

产品简介

Mach1-T1 电击感受态细胞只能用于电击转化, 不能用于热激转化。Mach1-T1 菌株由野生型 non-K-12 E. Coli W 菌株改造而来, 是目前生长速度较快的感受态细胞之一, 在平板上 9 h 可见克隆, 缺失核酸内切酶 (endA), 提高了质粒 DNA 的产量和质量; 重组酶缺陷型 (recA1398) 减少插入片段的同源重组概率, 保证了插入 DNA 的稳定性; lacZΔM15 的存在使 Mach1-T1 可用于蓝、白斑筛选; tonA 突变赋予 Mach1-T1 菌株对噬菌体 T1 和 T5 的抗性。Mach1-T1 电击感受态细胞经 pUC19 质粒 (2686bp, Amp^R) 检测转化效率 >10⁹ cfu/μg DNA。

基因型

F- $\phi 80(\text{lacZ})\Delta\text{M15 } \Delta\text{lacX74 hsdR(rK- mK+)} \Delta\text{recA1398 endA1 tonA}$

转化方法

1. 取适量睿必特复苏液置 37 度预热 1-2 小时 (每管感受态准备 10ml 复苏液)。
2. 杀菌处理后的 0.1 cm 电击杯和杯盖插入冰中, 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。

(A) 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/μl, 体积不超过 1/10 感受态。

(B) 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: $C=25 \mu F$, $PC=200 \Omega$, $V=1.8 kV$, 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 预热的睿必特复苏液(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, 向离心管中补加培养基至 10 ml。37°C, 250 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平板上(因菌量较大, 若全部涂板请选用培养皿 2-5 个)。将平板倒置放于 37°C 培养箱过夜培养 13-17 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。
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 ddH₂O 或 TE 缓冲液重悬产物, 保证 DNA 浓度不超过 100 ng/ 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。
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°C 以下, 高于 -80°C 超期储存会导致转化效率会下降。