

## DB3.1 电击感受态细胞

### DB3.1 Electroporation-Competent Cell 说明书

产品货号: ML-G27022

保存条件: -80℃

产品规格: 5×50μl 20×50μl

产品介绍

基 因 型

F- gyrA462 endA1 glnV44 (sr1-recA)mcrBmrr  
hsdS20(rB-,mB-)ara14galK2lacY1proA2rpsL20(Smr) xyl5 Δ leu mtl1

简 要 说 明

DB3.1 大肠杆菌菌株基因组中含有 gyrA462 基因，赋予其对 ccdB 毒性基因的

抗性，特别适用于构建或扩繁含有 *ccdB* 基因的质粒载体（例 GATEWAY System vector），此菌株具有链霉素抗性。MLBio High5™ 系列 DB3.1 感受态细胞经特殊工艺制作，经 pUC19 检测转化效率 >108 cfu/μg DNA。

## 操作说明

**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 5 分钟，待其沥干水分，正置 5 分钟，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 0.5 cm 以方便盖上杯盖，冰中静置 5 分钟充分降温。

**2.**取-80℃保存的 DB3.1 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. 测定转化效率使用 1 μl 10 pg/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 TrisHCl, pH7.5;1mM EDTA)重悬，DNA 浓度不超过 100ng/μl，体积不超过 5 μl/50 μl 感受态

**3.**用 200 μl 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=25 μF，PC=200 Ω，V=1.8 kV (此为 BioRad 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.**立即 向电击杯中加入 1000  $\mu$ l 不含抗生素的无菌培养基 S.O.C., 混匀后转移到空 50ml 管中, 并用 1ml SOC 轻柔冲洗电转杯并转移到 50ml 管中, 另补加 3ml SOC 培养基, 37 $^{\circ}$ C, 200 rpm 复苏 60 分钟。

**6.**5000 rpm 离心一分钟收菌, 重悬后取 100-200  $\mu$ l 涂布到含相应抗生素的 S.O.C 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 培养箱过夜培养过夜。

### 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 100 ng/ $\mu$ 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. 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。