

## EPI300 电击感受态细胞

### EPI300 Electroporation-Competent Cell 说明书

产品货号: ML-G27210

保存条件: -80℃

产品规格: 5×50μl 20×50μl

产品介绍

基 因 型

F - mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80dlacZΔM15 Δ  
lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara,leu)7697 galU galK λ -  
rpsL nupG trfA dhfr.

简 要 说 明

MLBio EPI300 电击感受态细胞只能用于电击转化，不能用于热激转化。

EPI300 细胞含有一个突变的 *trfA* 基因，该基因表达出的蛋白产物可以促进含有 *ori V* 复制子的质粒的高拷贝扩繁，诱导剂 I 可以诱导 *trfA* 基因的表达。当含有 *ori V* 复制子质粒的 EPI300 细胞在 LB/2YT 或 SOB 培养基中生长时，*trfA* 基因的表达被抑制，*ori V* 复制子质粒的拷贝数维持在很低的水平；当在培养基中加入诱导剂 I，*ori V* 复制子质粒的拷贝数可维持在很高的水平，提高了质粒产量。因此 EPI300 菌株可以降低 *ori V* 复制子质粒的拷贝数，特别适合于各种不稳定 DNA 或毒性基因的克隆。 [*mcrA*,  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)]基因型使 EPI300 菌株适合于克隆富含甲基胞嘧啶或甲基腺嘌呤的 DNA（例如：哺乳动物基因组 DNA）。*recA1* 和 *endA1* 的突变有利于插入 DNA 的稳定和高纯度质粒 DNA 的提取。*lacZ*  $\Delta$  M15 标记的存在使 EPI300 可用于蓝白斑筛选，*rpsL* 赋予其链霉素抗性。此外，EPI300 电击感受态细胞转化效率极高，特别适用于文库构建，MLBio 生产的 EPI300 电击感受态细胞经特殊工艺制作，pUC19 质粒检测转化效率  $>2 \times 10^{10}$  cfu/  $\mu$ g 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 0.5cm 以方便盖上杯盖，冰中静置 5 分钟充分降温。

**2.2.**取 -80℃ 保存的 EPI300 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  $\mu$ l 10 pg/ $\mu$ l 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 (10 mM Tris HCl, pH7.5; 1 mM EDTA)重悬，DNA 浓度不超过 100 ng/ $\mu$ l，体积不超过 5  $\mu$ l/50  $\mu$ l 感受态。

3.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，盖上杯盖。

4.启动电转仪，设置参数：C=25  $\mu$ F，PC=200  $\Omega$ ，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 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。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 TrisHCl, pH7.5; 1 mM EDTA) 重悬产物，保证 DNA 浓度不超过 100ng/ $\mu$ 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. 混入质粒时应轻柔操作，吸取感受态细胞时不可用孔径过小的枪头 (普通 200ul 枪头应剪去枪头尖 0.6cm) 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。