

BJ5183-AD-1 Electro

BJ5183-AD-1 Electroporation-Competent Cell 说明书

产品货号: ML-G27004

保存条件: -80℃

产品规格: 5×50μl 50×50μl

产品介绍

基 因 型

endA1 sbcBC recBC galK met thi-1 bioT hsdR (Strr) [pAdEasy-1 (Ampr)]

简 要 说 明

BJ5183-AD-1 是携带了腺病毒质粒 pAdeasy-1 的 BJ5183 菌株。-MLBio

BJ5183 菌株是一种具有较高重组活力的大肠杆菌菌株，是目前腺病毒系统最常用的感受态细胞。

BJ5183 菌株含有 **sbcBC recBC** 双重突变，赋予 **BJ5183** 细胞较强的重组能力，有利于转入的目的基因与腺病毒骨架质粒的重组。**endA1**（缺失核酸内切酶）的突变有利于重组 DNA 的稳定和高纯度质粒 DNA 的提取。**BJ5183-AD-1** 菌株细胞中已经提前转入了腺病毒质粒 **pAdeasy-1[encodes the Adenovirus-5 genome (E1/E3 deleted)]**，赋予该菌株氨苄抗性，在病毒质粒构建时，只需转入线性化的目的质粒即可，简化了实验步骤，提高了病毒质粒重组概率。

Strr 赋予 **BJ5183-AD-1** 菌株链霉素抗性。

BJ5183-AD-1 电击感受态细胞适用于普通质粒和大质粒的构建，经特殊工艺制作，**pCAMBIA2301** 质粒(size:1163bp)检测转化效率 $>1 \times 10^6$ cfu/ μ 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 **0.5 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 **BJ5183-AD-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 μ l 10 pg/ μ 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 (10mM TrisHCl, pH7.5;1mM EDTA)重悬，DNA 浓度不超过 **100ng/ μ l**，体积不超过 **5 μ l/50 μ l** 感受态

- 3.用 200 μ l 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 μ F，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 μ 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 μ 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 TrisHCl, pH7.5; 1 mM EDTA) 重悬产物，保证 DNA 浓度不超过 100ng/ 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°C 以下，高于 -80°C 超期储存会导致转化效率会下降。