

BJ5183-AD-1 Electroporation-Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: DE1076)

BJ5183-AD-1 Electroporation-Competent Cell	50µl /支
pCAMBIA2301 (control vector, 10ng/µl)	10µl
保存条件 (保质期):	-80°C (6个月)

● 基因型

endA1 sbcBC recBC galK met thi-1 bioT hsdR (Str^R) [pAdEasy-1 (Amp^R)]

● 产品说明

BJ5183-AD-1 是携带了腺病毒质粒 pAdEasy-1 的 BJ5183 菌株。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。Str^R 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>1×10⁶ cfu/µg DNA。

● 操作方法

- 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，待其沥干水分，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。
- 取 -80°C 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。
 - 测定转化效率使用 1 µl 10 pg/µl 的对照质粒 pCAMBIA2301;
 - 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/µl，体积不超过 5 µl/50 µl 感受态。
- 用 200 µl 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。
- 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。
- 2 分钟后从冰中取出电击杯，放室温，加入 700 µl 不含抗生素的无菌 S.O.C. 培养基 (室温)，用 1ml 枪吹吸电击杯底部数次混匀后，转移到 50 ml 离心管 (BD Falcon 50 ml 锥形离心管等)，向离心管中补加 S.O.C. 培养基至 10 ml。37°C，225 rpm 复苏 60 分钟。
- 5000 rpm 离心一分钟收菌，重悬后取 100-200 µl 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°C 培养箱过夜培养。

● S.O.C 培养基配方：

2% Tryptone
0.5% Yeast Extract
10 mM NaCl
2.5 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
20 mM glucose
PH-7.0

S.O.C. Medium is suitable for use in the final step of cell transformation to obtain maximal transformation efficiency of E. coli (Hanahan, 1983).

● 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/μl。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。