

## DB3.1 电击感受态细胞

### DB3.1 Electroporation-Competent Cell

保存条件： -80℃

产品规格:

DB3.1	5×100μl
pUC19 (control vector)	10pg/μl;10μl

基 因 型

F<sup>-</sup> *gyrA462 endA1 glnV44 (sr1-recA)mcrBmrr hsdS20(r<sub>B</sub><sup>-</sup>,m<sub>B</sub><sup>-</sup>)ara14galK2lacY1proA2rpsL20(Sm<sup>r</sup>) 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。DB3.1 感受态细胞经特殊工艺制作，经 pUC19 检测转化效率>10<sup>8</sup> cfu/μg DNA。

操 作 说 明

- 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。
- 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。
  - 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 (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。
3. 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。
  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 μl 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℃，200 rpm 复苏 60 分钟。
  6. 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℃ 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/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。