



ClearColi BL21(DE3) Electrocompetent Cells 产品说明书

产品规格 (CAT#: YC244D)

ClearColi BL21(DE3) Electrocompetent Cells :	50 μ l/支
pUC19 (control vector, 0.1ng/ μ l):	5 μ l
保存条件(保质期):	-80 $^{\circ}$ C (6个月)

产品介绍

ClearColi BL21 (DE3) 细胞是第一种商业化的感受态细胞, 具有修饰的 LPS (脂质 IVA), 不会触发人细胞的内毒素反应。ClearColi 细胞缺乏用于 hTLR4 / MD-2 激活的外膜激动剂; 因此, 与大肠杆菌野生型细胞相比, ClearColi®对 hTLR4 / MD-2 信号的激活作用要低几个数量级。由 ClearColi®制备的异源蛋白几乎没有内毒素活性。从 ClearColi 细胞中最少次纯化, 蛋白质或质粒 (可能包含脂质 IVA) 可用于大多数应用, 而不会引起人细胞内毒素反应。在 ClearColi 细胞中, 通常被六酰基化的 LPS 的两条次级酰基链已被删除, 从而消除了真核细胞内毒性的关键决定因素。LPS 的六个酰基链是触发因子, 与髓样分化因子 2 (MD-2) 结合时, 被 Toll 样受体 4 (TLR4) 识别, 从而引起 NF- κ B 的活化和促炎细胞因子的产生。两个二级酰基链的缺失导致脂质 IVA, 它不会诱导活化的异四聚体 TLR4 / MD-2 复合物的形成, 因此不会触发内毒素反应。另外, 寡糖链被删除, 使得更容易从任何下游产物中除去所得的脂质 IVA。ClearColi BL21(DE3) Electrocompetent Cells 电转态细胞由特殊工艺制作, pUC19 质粒检测转化效率达 10^{10} cfu/ μ g DNA。

基因型: F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm(DE3)

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 $^{\circ}$ C 保存的 BL21(DE3) 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 μ l 10 pg/ μ l 的对照质粒 pUC19;
 - 对于连接产物, 大部分公司的 T4 连接酶反应体系或 50 度反应重组体系可与 BL21(DE3) 电击感受态混合后电击转化, 无需进行 DNA 纯化, 但 DNA 浓度不能过高, DNA 浓度不超过 100 ng/ μ l, 体积不超过 5 μ l/50 μ l 感受态。
 - 对盐浓度较高的 DNA 溶液或反应体系请用乙醇沉淀 DNA 后加入适量 TE 缓冲液 (10 mM Tris HCl, pH7.5; 1 mM EDTA) 重悬, 然后与 BL21(DE3) 电击感受态混合进行电击转化。
- 用 200 μ 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。
- 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. 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。

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°C 培养箱过夜培养 13-17 小时。

S.O.C 培养基配方

2% Tryptone

0.5% Yeast Extract

10 mM NaCl

2.5 mM KCl

10 mM MgCl_2

10 mM MgSO_4

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，部分公司的连接体系或重组体系(例如：Thermo，NEB 公司的 T4 连接酶系统，NEB，天根的 50 度反应重组系统)可以直接与电击感受态混合后电击转化，无需纯化，但 DNA 浓度不能过高，最好不超过 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°C 以下，高于 -80°C 超期储存会导致转化效率会下降。