

Code No. 9053

研究用

TaKaRa

E. coli CJ236
Competent Cells

说明书

目 录

| 内 容 | 页 码 |
|------------|-----|
| ● 制品说明 | 1 |
| ● 制品内容 | 1 |
| ● 保 存 | 1 |
| ● 使用方法 | 1 |
| ● 质量控制 | 2 |
| ● Genotype | 2 |
| ● 细胞浓度 | 2 |
| ● 参考文献 | 3 |

● 制品说明

Takara 在 Hanahan' s method 基础上进行了改良, 制备出 *E.coli* CJ236 Competent Cells, 当 1 ng pUC119 转化 100 μ l 细胞时, 转化效率可达 1×10^7 cfu/ μ g。

E. coli CJ236 Competent Cells 适用于制备含有 dU 的 ssDNA。通过 CJ236 转化后富集的 ssDNA, 可用于 Kunkel 法进行定点突变。

● 制品内容

| | |
|--------------------------------------|-------------------------|
| <i>E. coli</i> CJ236 Competent Cells | 100 μ l \times 10 |
| pUC119 plasmid (0.1 ng/ μ l) | 10 μ l |
| SOC Medium* | 1 ml \times 10 |

| | | |
|---------------|--------|-------------------|
| * SOC Medium: | 2% | Tryptone |
| | 0.5% | Yeast extract |
| | 10 mM | NaCl |
| | 2.5 mM | KCl |
| | 10 mM | MgSO ₄ |
| | 10 mM | MgCl ₂ |
| | 20 mM | Glucose |

● 保 存

-80°C

注意: 如果不在-80°C下保存, 转化效率将会降低。此时, 在使用前, 请使用附带的 pUC119 对照质粒来验证细胞的转化效率。不能液氮保存。

● 使用方法

A. 质粒载体转化

1. *E.coli* CJ236 Competent Cells 使用前在冰上融化。
2. 轻微混合, 将 100 μ l 装入 14 ml 圆底 tube (CORNING #352059 或 #352057)。
注意: 不能剧烈振荡混合细胞。
3. 加入 DNA 样品 (建议 \leq 10 ng)。
4. 冰中放置 30 分钟。
5. 42°C 放置 45 秒。
6. 冰中放置 1-2 分钟。
7. 添加 SOC 培养基 (预先在 37°C 保温) 至终体积 1 ml。
8. 37°C 振荡培养 1 小时 (160-225 rpm)。
9. 取适量涂布于选择培养基。直径 9 cm 的平板的涂布量不超过 100 μ l。
10. 37°C 过夜培养。

B. M13 噬菌体载体转导

1. 步骤 1-8 同上。
2. 在 3 ml 的 YT-soft agar (预先 46°C~48°C 保温) 中, 加入 200 μ l 的宿主菌 (*E.coli* CJ236, A₆₀₀=0.8~1.0)。
3. 取适量 1. 与 2. 混合, 迅速铺于 YT-plate 上。
4. 平板置于室温放置 10~15 分钟后, 37°C 过夜培养。

【注意事项】

1. 将感受态细胞从 -80°C 冷冻取出后请立即置于干冰/乙醇中。使用前保存于干冰/乙醇中。
2. 可使用 microcentrifuge tubes 代替 Falcon tubes (CORNING #352059 或 #352057), 但效率可能会降低。
3. 当使用 $100\ \mu\text{l}$ 感受态细胞时, 加入的高纯度 DNA 样品不要超过 $10\ \text{ng}$ 。否则转化效率会降低。
4. 当改变感受态细胞数量或 tubes 类型时, 适当调整反应条件。例如, 当使用 microcentrifuge tubes 时, 42°C 放置 60 秒。
5. L-broth 或 ϕ b-broth 可替代 SOC 培养基。此时, 转化效率可能会降低。

| L-broth : Ingredient | per liter water |
|----------------------|-----------------|
| Tryptone | 10 g |
| Yeast extract | 5 g |
| NaCl | 5 g |

用 $1\ \text{N}$ NaOH 调整 pH 到 7.5 并高压灭菌。

| ϕ b-broth: Ingredient | per liter water |
|---|-----------------|
| Tryptone | 20 g |
| Yeast extract | 5 g |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 5 g |

用 $1\ \text{N}$ KOH 调整 pH 到 7.5 并高压灭菌。

6. 稀释时使用 SOC 培养基。
7. 建议在选择培养基中加入 Chloramphenicol ($30\ \mu\text{g}/\text{ml}$) 以保证 F' 质粒稳定。
8. YT soft agar: Ingredient per 100 ml water

| | |
|---------------|-------|
| Tryptone | 0.8 g |
| Yeast extract | 0.5 g |
| NaCl | 0.5 g |

用 $1\ \text{N}$ NaOH 调整 pH 到 7.6, 加入 agar 至浓度为 0.6%, 并高压灭菌。

9. YT-plate: Ingredient per liter water
- | | |
|---------------|-----|
| Tryptone | 8 g |
| Yeast extract | 5 g |
| NaCl | 5 g |

用 $1\ \text{N}$ NaOH 调整 pH 到 7.5, 加入 agar 至浓度为 1.5%, 并高压灭菌。

10. 制备感受态细胞。
11. 不建议将解冻的感受态细胞再次冷冻保存。但是, 如果再次冻结不可避免, 将细胞置于干冰/乙醇中迅速冷冻, 置于 -80°C 保存。但是, 转化效率可能会降低至少一个数量级。

● 质量控制

转入 $1\ \text{ng}$ 的 pUC119, 涂于含有 Amp^+ 的选择培养基进行筛选。

转化效率: $>1 \times 10^7\ \text{cfu}/\mu\text{g pUC119}$

● Genotype

E. coli CJ236 : *dut1, ung1, thi-1, recA1 / pCJ105 (F' cam)*

● 细胞浓度

$1-2 \times 10^9\ \text{bacteria}/\text{ml}$

● 参考文献

- 1) Hanahan D. *J Mol Biol* . (1983) **166**: 557.
- 2) Kunkel T A. *Proc Natl Acad Sci USA* . (1985) **82**: 488.
- 3) Kunkel T A. *Methods in Enzymology*. (1985) **154**: 367.
- 4) Zoller M J and Smith M. *Methods in Enzymology*. (1983) **100**: 468.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takarabio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>

v202012Da