



ClearColi BL21(DE3) 电转感受态细胞

ClearColi BL21(DE3) Electroporation Competent Cell

Cat.NO. ZC1251D

目录编号	产品名称	包装单位
<input type="checkbox"/> ZC1251D-1	ClearColi BL21(DE3) 电转感受态细胞	5×50μl
<input type="checkbox"/> ZC1251D-2	ClearColi BL21(DE3) 电转感受态细胞	20×50μl

备注: 以上包装均含有 Compcell Control Plasmid pUC19(0.1ng/μl)5μl (质量控制用)。

储存: -70°C 保存六个月。

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-κB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。

产品特点:

- Genetically modified LPS does not trigger endotoxic response in human cells;
- Ideal for mammalian cell immunogenicity testing, toxicity ass.

操作方法:

1. 电极间距为 0.1cm 的电转杯 (Gene Pulser®/MicroPulser™ electroporation cuvettes) 插入碎冰中, 压实冰面, 冰中静置 5 分钟, 使电转杯充分降温。(电转杯重复使用方法: 每次用完后, 用大量的自来水冲洗干净去掉菌液和 DNA, 用蒸馏水洗 3 遍, 将其泡在 75% 乙醇中 30 分钟, 取出杯子, 沥干液体, 放在超净台中, 使乙醇充分挥发, 盖上盖子放干燥地方备用)。
2. 取 -70°C 保存的感受态细胞插入冰中, 待细胞刚化冻后, 加入质粒 DNA 或连接产物(洗脱或溶解质粒的溶液中离子不能太高, 或用双蒸水稀释, 对照 pUC19 可以用无菌水稀释到 10pg/μl), 用手指拨打管底轻轻混匀, 立即插入冰中, 在超净台中用无菌吸头将细胞 /DNA 混合物快速转移到电击杯中, 避免产生气泡, 确保细胞沉到杯底, 盖上杯盖, 空管保留待用。



3. 启动电转仪, 设置电击参数: 2.4kV, 200Ω, 25μF (BTX ECM 630 或 Bio-Rad GenePulser)。用纸巾擦掉电转杯外部的水分, 将电转杯放入电转槽中进行电击。完成后, 将电转杯插入冰中, 加入 950μl 无抗生素的 SOC 或 LB 培养基, 并将液体转移到原来保留的感受态空管中, 37°C, 150-250rpm 振荡培养 1 小时。
4. 取 100-200μl 左右的菌液或稀释后的菌液, 涂布于含相应抗生素的 LB 平板上, 倒置放于 37°C 培养箱培养 12-18 小时。

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. DNA 加入到细胞中后, 立即进行电击操作; 电击完成后立刻加上 LB 或 SOC 等复苏培养基, 每分钟延迟加入会导致 3 倍转化效率的降低。
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. 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。
6. 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。
7. 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 (10mM Tris HCl, pH7.5; 1mM EDTA) 重悬产物, 保证 DNA 浓度不超过 100ng/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。
8. 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 200μl 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。
9. 电击感受态细胞最好保存在 -70°C 以下, 高于 -70°C 超期储存会导致转化效率下降。