



HT115(DE3)感受态细胞

产品信息:

组成	BC216-01
HT115(DE3) Competent cells	20×100μl
pUC19 (0.1ng/μl)	5μl

储存条件: -70℃保存, 避免反复冻融。

产品说明:

HT115(DE3)是 RNase III 缺陷型大肠杆菌菌株, 可以用 IPTG 诱导方法表达生产 dsRNA。用于 RNAi 干扰试验。该菌株又具备λ噬菌体 DE3 区, 可以表达 T7 RNA 聚合酶, 适用于含有 T7 启动子的原核表达载体 (如 pET 等) 的高效表达。非 T7 启动子的表达载体 (如 pGEX, pMal, pTrc 等载体) 也可以在该菌株中表达。HT115(DE3)感受态细胞由特殊工艺制成, pUC19 质粒检测转化效率达 1×10^6 cfu/μg DNA。

基因型: F- mcrA mcrB, IN(rrnD-rrnE)1 rnc14::Tn10λ(DE3 lavUV5::T7 polymerase)

菌株抗性: 对氨苄青霉素、卡那霉素、壮观霉素、氯霉素和链霉素敏感。具有四环素抗性。

质粒转化步骤:

1. 将感受态细胞置于冰水浴中化冻。待细胞刚化冻后, 加入目的质粒到细胞中, 用手指拨打管底, 轻轻混匀;
2. 冰水浴中放置 30 分钟, 不要晃动;
3. 42℃热击 60 秒钟, 不要晃动;
4. 冰水浴中放置 2 分钟, 不要晃动;
5. 加入 500μl 无菌的 SOC 或 LB 培养基;
6. 置于 37℃摇床中, 150-200rpm 震荡复苏培养 60 分钟;
7. 取 50-100μl 菌液涂布在含有抗性的 LB 平板上。待液体吸干后, 倒置平板, 37℃培养 12-16 小时。

(**平板划线分离法:** 复苏培养结束后, 12000rpm 离心 30 秒钟, 弃掉上清, 留 100μl 左右的液体, 用 200μl 吸头轻轻吹打散菌块, 取 10μl 重悬的菌液分多点滴在平板上, 倾斜吸头, 用吸头头部的侧面将滴在平板上的液体来回划线。这个方法可以获得更多更大的单克隆菌落。)

(**质粒快速转化步骤:** 对于氨苄青霉素抗性的质粒, 将步骤 2 的时间缩短到 5 分钟, 步骤 4 完成后, 可直接涂布或划线于含氨苄青霉素抗性的 LB 平板上。其它抗性的质粒仍需 60 分钟的复苏培养。)

蛋白表达步骤:

1. 挑取单菌落, 接种到含 5ml 带抗生素的 LB 培养基中;
2. 37℃, 200rpm 震荡培养细菌至对数生长期 (OD600=0.4-0.8);
3. 加入 IPTG 到终浓度为 0.4mM, 37℃诱导 2-4 小时或 16℃诱导过夜;
4. 诱导完成后, 离心收集菌体, 用合适的方法 (如考马斯亮蓝染胶法, Western-Blot 法或酶活性分析法) 分析菌体裂解物的总蛋白、上清和沉淀组分, 明确表达产物的表达状况 (可溶性或不溶性表达);
5. 大量表达时, 可用 10ml 过夜培养物转接到 1L 培养基中, 当培养到 OD600=0.4-0.8 时, 加入终浓度为 0.4mM 的 IPTG, 37℃诱导 2-4 小时或 16℃诱导过夜。(不同蛋白表达的最佳条件有所不同, 需在实验中优化。)