



ArcticExpress(DE3)感受态细胞

产品信息:

组成	BC218-01
ArcticExpress(DE3)	20×100μl
pUC19 质粒	5μl

储存条件: -70℃保存, 避免反复冻融。

产品说明:

ArcticExpress(DE3)细胞来源于 BL21-Gold 菌株, 属于 Lon 和 OmpT 蛋白酶缺陷型的大肠杆菌 B 菌株。菌株含有庆大霉素抗性的质粒能稳定表达海洋细菌 *Oleispira antarctica* 的两个低温分子伴侣 Cpn10 和 Cpn60。这些伴侣蛋白在较低温度 (4-12℃) 下, 比大肠杆菌 GroEL/GroES 表现出更高的活性, 在低温下可以更好地促进重组蛋白的正确折叠, 潜在地增加了可溶性重组蛋白的产率和活性, 克服重组蛋白的错误折叠和不溶性。该菌株又具备λ噬菌体 DE3 基因区, 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。ArcticExpress(DE3)感受态细胞由特殊工艺制成, pUC19 质粒检测转化效率大于 1×10^7 cfu/μg DNA。

基因型: F⁻ ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) dcm⁺ Tet^r gal λ(DE3) endA Hte (cpn10 cpn60 Gent^r)

菌株抗性: 具有庆大霉素、四环素抗性。对氨苄青霉素、卡那霉素、壮观霉素、链霉素、氯霉素敏感。

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, 加入质粒 DNA 或 5-10μl 连接产物到细胞中, 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 20ug/ml 的庆大霉素和适当浓度的转化质粒的抗性抗生素的 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。)

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;
(低温诱导方法: 37℃, 200rpm 震荡培养细菌到 1-2 个 OD 左右, 然后将培养物降温至 10-13℃, 低温培养 15 分钟达到平衡, 将 IPTG 添加到摇瓶中, 最终浓度达到为 0.1-0.5mM 之间。继续诱导培养 12-24 小时。)
4. 诱导完成后, 离心收集菌体, 用合适的方法 (如考马斯亮蓝染色法, 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)

BM20221219