



OrigamiB(DE3)pLysS 感受态细胞

产品信息:

组成	BC219-01	BC219-02
OrigamiB(DE3)pLysS Competent Cell	10×100μl	20×100μl
pUC19 (0.1ng/μl)	5μl	5μl

产品储存: -70℃保存, 避免反复冻融。

产品介绍:

Origami B (DE3) pLysS 菌株携带 pLysS 质粒, 具有氯霉素抗性。pLysS 可表达 T7 溶菌酶 (T7 溶菌酶可以作用于大肠杆菌细胞壁上的肽聚糖溶解大肠杆菌, 还可与 T7 RNA 聚合酶结合抑制其转录活性, 进而降低目的基因的背景表达水平, 但不干扰 IPTG 诱导的表达), 适合表达毒性蛋白和非毒性蛋白。Origami B (DE3) pLysS 菌株表达突变的硫氧还蛋白还原酶 (thioredoxin reductase) (trxB) 和谷胱甘肽还原酶 (glutathione reductase) (gor), 这两个酶是还原途径的关键酶, 突变后有利于形成正确折叠的含有二硫键的蛋白, 增强蛋白的可溶性。此外, 该菌株染色体整合了λ噬菌体 DE3 区 (DE3 区含有 T7 噬菌体 RNA 聚合酶), 可同时表达 T7 RNA 聚合酶和大肠杆菌 RNA 聚合酶, 可用于 pET 系列, pGEX, pMAL 等质粒的蛋白表达, 具有氯霉素、卡那霉素和四环素抗性, 不能用于具有氯霉素, 卡那霉素抗性质粒的表达。Origami B (DE3) pLysS 感受态细胞由特殊工艺制作, pUC19 质粒检测转化效率 >10⁷ cfu/μg DNA。

基因型: FompT hsdS_B(r_Bm_B⁻) gal dcm lacY1 ahpC (DE3) gor522::Tn10 trxB (Kan^R, Tet^R) pLysS Cam^R

操作步骤:

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: 将步骤 2 的时间缩短到 5 分钟, 对于氨苄青霉素抗性的质粒, 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：

2. 挑取单菌落，接种到含 5ml 带抗生素的 LB 培养基中；
3. 37°C，200rpm 震荡培养细菌至对数生长期（OD600=0.4-0.8）；
4. 加入 IPTG 到终浓度为 0.4mM，37°C 诱导 2-4 小时或 16°C 诱导过夜；
5. 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）；
6. 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°C 诱导 2-4 小时或 16°C 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）。

20230323