

## ER2566 Chemically Competent Cell 产品说明书

### ● 产品规格 (CAT#: EC1060)

ER2566 Competent Cell	100µl /支
pUC19 (control vector, 10pg/µl)	10µl
保存条件 (保质期):	-80°C (6个月)

### ● 基因型

F<sup>-</sup>  $\lambda$ -*fhuA2* [*lon*] *ompT* *lacZ*::T7 *gene1* *gal* *sulA11*  $\Delta$ (*mcrC-mrr*)114::IS10 R(*mcr-73*::miniTn10-TetS)2  
R(*zgb-210*::Tn10) (TetS) *endA1* [*dcm*]

### ● 产品说明

ER2566 菌株是 NEB 公司开发的具有超高转化效率的蛋白表达原核菌株，来源于 BL21。Lac 启动子启动下游 T7RNA 聚合酶的表达，可用于 T7 启动子表达载体(如 pET 系列)的高水平蛋白表达。*fhuA2* 赋予 ER2566 菌株对噬菌体 T1 的抗性。同时 ER2566 为 *lon* 和 *ompT* 蛋白酶缺陷菌株。*Lon* 蛋白酶和膜外蛋白酶 OMPT 的缺失能够有效抑制表达的异源蛋白在大肠杆菌体内的降解， $\Delta$ (*mcrC-mrr*)114，*mcr-73* 突变的存在使 ER2566 菌株无法对外源 DNA 进行标记、限制，提高了外源甲基化 DNA 的转化效率。ER2566 感受态细胞由特殊工艺制作，pUC19 质粒 (2686bp, Amp<sup>R</sup>) 检测转化效率>10<sup>9</sup> cfu/µg DNA。

### ● 操作方法

1. ER2566 感受态细胞从-80°C拿出，迅速插入冰中，5分钟后待菌块融化，加入目的质粒，并用手拨打 EP 管底轻轻混匀(避免用枪吸打)，冰中静置 25 分钟。
2. 42°C水浴热激 45 秒，迅速放回冰上并静置 2 分钟，晃动会降低转化效率。
3. 向离心管中加入 700 µl 不含抗生素的无菌培养基 (2YT 或 LB)，混匀后 37°C，200 rpm 复苏 60 分钟。
4. 5000 rpm 离心一分钟收菌，留取 100 µl 左右上清轻轻吹打重悬菌块并涂布到含相应抗生素的 2YT 或 LB 培养基上。
5. 将平板倒置放于 37°C培养箱过夜培养。

### ● 蛋白小量诱导表达 Protocol (for reference only)

1. 小摇接菌：在透气试管或透气离心管中准备 1-3ml 含相应抗生素的液体 LB（或 2YT、TB、SB 等营养丰富培养基），接入一个含有目的质粒的新鲜单菌落。
2. 37°C，200 rpm 过夜摇菌约 10-15h。
3. 大摇接菌：将第一步的小摇菌液按 1-2%比例接菌到 50ml 含相应抗生素的 LB（或 2YT、TB、SB 等营养丰富培养基），为增加溶氧，最好使用 500ml 三角瓶（加入营养液的体积一般为三角瓶标定体积的 1/10，最高不超过 1/5）。
4. 37°C，150 rpm 摇菌到 OD600 值为 0.5-0.8（一般需要 2-4h）。
5. 空白对照取样（可选步骤）：在加入诱导剂 IPTG 前可取样 1ml 菌液到 1.5ml 离心管中，12000rpm 离心 10 分钟，弃上清，沉淀放-20°C保存待用。
6. 第四步的三角瓶中加入 IPTG 至终浓度为 1mM（IPTG 浓度可自由调整），继续 37°C，120 rpm 摇菌 2-4h。
7. 不同时间点取样（可选步骤）：最佳摇菌时间与所表达蛋白有关，表达蛋白不同最佳摇菌时间不同，为找到最佳诱导时间可在不同诱导时间点取样（例：在诱导第 2h，4h，6h，8h，14h 取样，离心后放-20°C保存）。
8. 离心收菌：三角瓶从摇床拿出，埋入冰中 10 分钟，4°C，5000g，10 分钟离心，弃上清，沉淀保存在-20°C。
9. 待所有样品准备妥当，可以做 SDS-PAGE 分析蛋白表达。

### ● 1 M IPTG 溶液配制（唯地 CAT#: YC8022）：

2.38 g IPTG 加入无菌的双蒸水 10 mL，完全溶解后用 0.22um 的滤膜过滤除菌。

### ● 注意事项

1. 感受态细胞最好在冰中缓慢融化，插入冰中 8 分钟内加入目标 DNA，不可在冰中放置时间过长，长时间存放会降低转化效率。
2. 混入质粒时应轻柔操作。
3. 转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。
4. 诱导时，IPTG 浓度可选（0.1-2 mM 均可）。
5. 为获得需要量的蛋白，最佳诱导时间，温度，IPTG 浓度需实验者优化。