

ArcticExpress (DE3) pRARE2 Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: EC2021)

ArcticExpress (DE3) pRARE2 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

E. coli B F- ompT hsdS(rB- mB-) dcm+ Tet^r gal λ(DE3) endA Hte [cpn10cpn60 Gent^r] pRARE2 (Cam^R)

● 产品说明

ArcticExpress (DE3) pRARE2 来源于 ArcticExpress (DE3), 将具有氯霉素抗性的 pRARE2 质粒导入 ArcticExpress (DE3) 细胞中即是 ArcticExpress (DE3) pRARE2。ArcticExpress (DE3) pRARE2 菌株染色体 DNA 中整合了 λ 噬菌体 DE3 区, 使得 ArcticExpress (DE3) pRARE2 菌株可同时表达 T7 RNA 聚合酶和大肠杆菌 RNA 聚合酶, 广泛用于 pET 系列, pGEX, pMAL 等质粒的蛋白表达。ArcticExpress (DE3) pRARE2 菌株具有四环素, 庆大霉素, 氯霉素抗性, endA1 突变有利于质粒 DNA 的稳定。[cpn10cpn60 Gent^r] 的存在使 ArcticExpress (DE3) pRARE2 可以表达适应低温的伴侣蛋白 Cpn10 和 Cpn60 (来自嗜冷菌—*Oleispira antarctica*)。Cpn10 和 Cpn60 伴侣蛋白在 4-12°C 表现出较高活性, 在 ArcticExpress (DE3) pRARE2 细胞中表达时, 可降低重组蛋白包涵体的形成, 增加可溶重组蛋白的表达量及生物活性, 比传统的原核表达伴侣蛋白 GroEL、GroES 等具有更加优异的促融能力。同时, pRARE2 质粒可补充大肠杆菌缺乏的 7 种稀有密码子(AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA 和 CGG)对应的 tRNA, 提高外源基因的表达水平。唯地生物生产的 ArcticExpress (DE3) pRARE2 感受态细胞经特殊工艺制作, pUC19 质粒 (2686bp, Amp^R) 检测转化效率 >10⁸cfu/μg DNA。

● 操作方法

1. ArcticExpress (DE3) pRARE2 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 管底混匀, 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 (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 LB 培养基上 ((平板中务必同时含有 34ug/ml 的氯霉素, 20ug/ml 的庆大霉素和转化质粒本身的筛选抗生素; 若质粒浓度较高, 也可稀释后涂板, 务必保证能在平板上挑到单克隆菌落)。
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，220-250 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%比例接种到 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. 30°C，220-250 rpm 摇菌到 OD600 值为 0.5-0.8（一般需要 2.5-4h）。
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. 测 OD 值之前预先准备一低温摇床，温度设置 10-13°C，将第四步的三角瓶放入低温摇床 220-250 摇菌 10 分钟，温度降至 10-13 度后加入 IPTG 至终浓度为 1mM（IPTG 浓度可自由调整），继续摇菌 24h。
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 16h，20h，22h，24h，28h 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。

● 氯霉素配制（唯地 CAT#：YC9030）：

氯霉素(Chloramphenicol) 100mg/ml 溶于乙醇，完全溶解后用 0.22um 的滤膜过滤除菌；工作浓度：34 µg/ml。

● 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. ArcticExpress (DE3) pRARE2 菌株携带 pACYC、pRARE2 质粒，除复苏培养基为无抗生素外，其余所用培养基、培养液均应含有 34 µg/ml 氯霉素、20ug/ml 的庆大霉素，以防质粒丢失。
3. 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。
4. ArcticExpress (DE3) pRARE2 感受态细胞具有四环素、庆大霉素、氯霉素抗性，不可用于具有四环素、庆大霉素、氯霉素抗性质粒的转化。