

SHuffle T7 Express E. coli B

Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: EC2031)

SHuffle T7 Express E. coli B 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

fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT ahpC gal latt::pNEB3-r1-cDsbC (Spec^R, lacI^q) ΔtrxB sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10 --Tet^S) endA1 Δgor Δ(mcrC-mrr)114::IS10

● 产品说明

SHuffle T7 Express E. coli B 菌株是大肠杆菌 B 型菌株的衍生菌株，与 BL21 具有更近的亲缘关系。该菌株的染色体中整合了一个拷贝的二硫键异构酶 DsbC 基因，可以促进含有二硫键蛋白的正确折叠；此外 DsbC 还是一个分子伴侣，可以帮助不含二硫键蛋白正确折叠，形成正确构象，同时该菌株缺少 Lon 蛋白酶和 OmpT 蛋白酶，可减少对重组蛋白的降解。SHuffle T7 Express E. coli B 菌株染色体中整合了一个拷贝的 T7 RNA 聚合酶基因，可以表达噬菌体 T7 RNA 聚合酶，适合于 T7 启动子诱导的蛋白表达；该菌株还可以表达大肠杆菌 RNA 聚合酶，所以可用于 pET 系列，pGEX，pMAL 等质粒的蛋白表达。SHuffle T7 Express E. coli B 菌株具有抗 T1 噬菌体感染的特点，具有链霉素，壮观霉素抗性。SHuffle T7 Express E. coli B 感受态细胞由特殊工艺制作，pUC19 质粒 (2686bp, Amp^R) 检测转化效率 > 10⁸ cfu/μg DNA。

● 操作方法

1. SHuffle T7 Express E. coli B 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，迅速放回冰中并静置 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 LB 无菌培养液，37°C，200 rpm 复苏 60 分钟。
4. 5000 rpm 离心一分钟收菌，留取 50 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。
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. 转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。
3. 诱导时，IPTG 浓度可选（0.1-10 mM 均可）。
4. 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。
5. SHuffle T7 Express E. coli B 菌株具有链霉素，壮观霉素抗性，不可用于具有链霉素，壮观霉素抗性质粒的转化。