

Rosetta-gami B(DE3) Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT# : EC1012)

Rosetta-gami B(DE3) Competent Cell	100μl /支
pUC19 (control vector, 10ng/μl)	10μl
保存条件 (保质期):	-80°C (6个月)

● 基因型

F⁻ *ompT hsdSB*(r_Bm_B) *gal dcm lacY1 ahpC* (DE3) *gor522::Tn10 trxB pRARE* (Cam^R, Kan^R, Tet^R)

● 产品说明

Rosetta-gami B(DE3) 菌株聚合了 BL21, Tuner, Origami 和 Rosetta 四种菌株的优点:

- * *lacY1* 基因 (半乳糖苷透性酶基因)突变赋予其 Tuner 菌株的优点——IPTG 以均一速度进入体系中大肠杆菌的每个细胞, 产生更加严格、均一的浓度依赖。
- * *pRARE* 赋予其 Rosetta 菌株的优点——补充大肠杆菌缺乏的 6 种稀有密码子(AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA)对应的 tRNA, 提高外源基因的表达水平。
- * *gor522::Tn10 trxB* 赋予其 Origami 菌株的优点——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*)基因, 它们是还原途径的两个关键酶, 其突变有利于高效形成正确折叠的含有二硫键的蛋白, 增强蛋白的可溶性。
- * 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)适合 T7 启动子诱导的蛋白表达。
- * Rosetta-gamiB(DE3)菌株具有卡那霉素, 氯霉素, 四环素抗性, 由特殊工艺制作, 经 pUC19 质粒 (2686bp, Amp^R) 检测转化效率>10⁷ cfu/μg DNA。

● 操作方法

1. Rosetta-gamiB(DE3)菌株感受态细胞从-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 34 μg/ml 氯霉素及所选质粒筛选抗生素的 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。

● 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. 混入质粒时应轻柔操作，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（0.1-2 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. Rosetta-gamiB(DE3)菌株携带 pRARE 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，以防质粒丢失。
6. 具有卡那霉素抗性，不能用于具有卡那霉素抗性质粒的表达。