

## BL21-Gold(DE3)pRARE2

### Chemically Competent Cell 产品说明书

#### ● 产品规格 (CAT#: EC2114)

BL21-Gold(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<sup>-</sup> *ompT* *hsdS*(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *dcm*<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> *gal* λ(DE3) *endA* Hte pRARE2 (Cam<sup>R</sup>)

#### ● 产品说明

BL21-Gold(DE3)pRARE2 菌株来源于 Stratagene 公司的 BL21 菌株, 缺少 Lon 蛋白酶和 OmpT 蛋白酶, 减少对重组蛋白的降解。BL21-Gold(DE3)pRARE2 菌株的染色体中整合了一个有功能的 Dcm 甲基化酶, 可以促进质粒的稳定, 防止被自身的限制酶系统降解; 引入了 Hte 基因, 可以提高转化效率; 缺失核酸内切酶 (*endA*), 提高了质粒 DNA 的产量、质量和稳定性。另外该菌株与 BL21(DE3)一样, 染色体中也整合了 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, 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可用于 pET 系列、pGEX、pMAL 等质粒的蛋白表达, 同时具有四环素、氯霉素抗性。BL21-Gold(DE3)pRARE2 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 > 5 × 10<sup>8</sup> cfu/μg DNA。

#### ● 操作方法

1. BL21-Gold(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 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 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 1 分钟，弃上清，沉淀放-20°C保存待用。
6. 蛋白的诱导表达：
  - 1) 若选择 37 度诱导蛋白，直接在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。
  - 2) 若选择低温诱导，可将第四步的三角瓶放入冰水中 1-5min，待菌液温度接近所选温度时，拿出三角瓶，加入 IPTG 至终浓度为 1mM（IPTG 浓度可自由调整），继续 120 rpm 摇菌培养（一般 25 度需培养 10-16h，16 度需培养 16-24h，12 度需培养 20-36h；最佳诱导时间，温度，IPTG 浓度需实验者优化）。
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，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。
2. BL21-Gold(DE3)pRARE2 菌株携带 pRARE2 质粒，除复苏培养基无抗生素外，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。
3. BL21-Gold(DE3)pRARE2 菌株具有四环素、氯霉素抗性，不可用于具有四环素、氯霉素抗性质粒的转化。
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。