

Lemo21(DE3) Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT# : EC3001)

Lemo21(DE3) 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 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS / pLemo(Cam^R)

● 产品说明

Lemo21(DE3)菌株适用于毒性蛋白, 膜蛋白, 及其他容易形成包涵体的蛋白的原核表达; 缺少 Lon 蛋白酶和 OmpT 蛋白酶, 减少对重组蛋白的降解; *fhuA2* 突变赋予 Lemo21(DE3)菌株对噬菌体 T1 的抗性。大肠杆菌中的膜蛋白表达和输出都受到 Sec 转位酶转运能力的限制, 如果 T7 RNA 聚合酶的活力过高, 超过 Sec 转位酶的转运能力, 会导致蛋白毒性产生或包涵体的形成, pLemo 质粒 (具有氯霉素抗性) 含有一个鼠李糖诱导的 T7 溶菌酶表达框, 可以高效表达 T7 溶菌酶, T7 溶菌酶是 T7 RNA 聚合酶的抑制剂, 可抑制 T7 RNA 聚合酶的转录活性, 降低目标蛋白的合成速度, 减少包涵体的形成, 提高毒性蛋白, 膜蛋白, 及其他容易形成包涵体的蛋白的原核表达成功率。Lemo21(DE3)可同时表达 T7 RNA 聚合酶和大肠杆菌 RNA 聚合酶, 用于 pET 系列, pGEX, pMAL 等质粒的蛋白表达。Lemo21(DE3)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. Lemo21(DE3)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, 将平板倒置放于 37°C 培养箱过夜培养 (Lemo21(DE3)菌株携带 pLemo 质粒, 除复苏培养基为无抗生素外, 其余所用培养基、培养液均应同时含有 34 µg/ml 氯霉素, 以防质粒丢失)。

● 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 (唯地 CAT# : CM1018L)、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。以质粒 pet32a 为例：在 TB 营养液中过夜培养的菌体浓度约为 LB 的 3-5 倍，SOB 的 2-3 倍。
2. 37°C, 200 rpm 过夜摇菌约 10-15h。
3. 鼠李糖浓度的确定：对一些难表达的蛋白需要做鼠李糖的梯度试验，在大摇接菌的同时加入不同浓度的鼠李糖 (0、100、250、500、750、1000、2000 μM)。此步骤非必须，对容易表达的蛋白可不添加鼠李糖。
4. 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)。
5. 37°C, 150-200 rpm 摇菌到 OD600 值为 0.5-0.8 (一般需要 2-4h)。
6. 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。
7. 第五步的三角瓶中加入 IPTG 至终浓度为 0.4mM (IPTG 浓度可自由调整)，继续 37°C, 120 rpm 摇菌 2-4h。
8. 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)。
9. 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。
10. 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，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. 诱导蛋白时，IPTG 浓度可选 (0.1-2 mM 均可)，最佳的鼠李糖浓度，诱导时间，温度，IPTG 浓度需优化。
3. 对毒性大的蛋白，在转化感受态涂平板这一步应加入 1000 μM 的鼠李糖，以促进阳性菌落的形成，并且后面的所有步骤都应该在培养基中加入鼠李糖。
4. Lemo21(DE3)菌株携带 pLemo 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。