

BL21-Gold(DE3) pLysS Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: EC2113)

BL21-Gold(DE3) pLysS 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*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^r *gal* λ(DE3) *endA* *Hte* pLysS Cam^R

● 产品说明

BL21-Gold(DE3) pLysS 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) pLysS 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, 可用于 pET 系列、pGEX、pMAL 等质粒的蛋白表达。BL21(DE3)pLysS 菌株携带 pLysS 质粒, 具有氯霉素抗性, pLysS 含有表达 T7 溶菌酶的基因, T7 溶菌酶可以作用于大肠杆菌细胞壁上的肽聚糖溶解大肠杆菌, 还可与 T7 RNA 聚合酶结合抑制其转录活性, 进而降低目的基因的背景表达水平, 但不干扰 IPTG 诱导的表达, 适合表达毒性蛋白和非毒性蛋白。BL21-Gold(DE3) pLysS 同时具有四环素、氯霉素抗性。BL21-Gold(DE3) pLysS 感受态细胞由特殊工艺制作, pUC19 质粒 (2686bp, Amp^R) 检测转化效率 > 5 × 10⁸ cfu/μg DNA。

● 操作方法

1. BL21-Gold(DE3) pLysS 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。
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，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) pLysS 菌株携带 pLysS 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) pLysS 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。