

SHuffle T7 Express E. coli B pRARE Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: EC2033)

SHuffle T7 Express E. coli B pRARE 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::mini Tn10--Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10 --Tet^S) endA1 Δgor Δ(mcrC-mrr)114::IS10 pRARE(CamR)

● 产品说明

SHuffle T7 Express E. coli B pRARE 来源于 SHuffle T7 Express E. coli B, 是 SHuffle T7 Express E. coli B 衍生菌株, 属于 B 亚型; 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, 可提高外源基因, 尤其是真核基因在原核系统中的表达量。该菌株染色体中整合了一个二硫键异构酶 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, 可减少目标蛋白的降解。SHuffle T7 Express E. coli B pRARE 菌株染色体中整合了一个拷贝的 T7 RNA 聚合酶, 可以表达噬菌体 T7 RNA 聚合酶, 适合 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, 适合 pET 系列, pGEX, pMAL 等质粒的蛋白表达。SHuffle T7 Express E. coli B pRARE 菌株具有抗 T1 噬菌体的特点, 具有链霉素, 壮观霉素, 氯霉素抗性。SHuffle T7 Express E. coli B pRARE 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。

● 经典热激转化操作方法

1. SHuffle T7 Express E. coli B pRARE 感受态细胞从 -80°C 拿出, 迅速插入冰中, 3-5 分钟后待菌块融化(融化一半即可使用), 加入目的质粒, 并用手拨打 EP 管底混匀(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。

● 快速转化操作方法 (10min 完成)

1. 提前 15 分钟将用到的筛选培养基平板拿到 37°C 预热。

2. SHuffle T7 E. coli B pRARE 感受态细胞从-80°C拿出，迅速插入冰中，3-5 分钟后待菌块融化(融化一半即可使用)，加入目的质粒并用手拨打 EP 管底混匀，冰中静置≥5 分钟（5-90min 均可）。
3. 用 200ul 枪将感受态细胞-DNA 混合物转移到已经 37°C 预热的 LB 培养基上，涂均匀，表面无水渍。
4. 将平板倒置放于 37°C 培养箱过夜培养。

注意：SHuffle T7 E. coli B pRARE 即可用热激法转化也可以用快转法转化，用快速转化方法涂氨苄/羧苄青霉素抗性平板时效率较高，涂卡那霉素或其他抗生素平板时，转化效率下降(因无孵育步骤，卡那霉素等对菌体毒性较大)。

● 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；转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量；诱导蛋白时，IPTG 浓度可选（0.1-10 mM 均可）；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。
2. SHuffle T7 Express E. coli B pRARE 具有链霉素，壮观霉素，氯霉素抗性，不可用于具有链霉素/壮观霉素/氯霉素抗性质粒的转化。
3. SHuffle T7 Express E. coli B pRARE 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。