

### C41(DE3) pLysS Chemically Competent Cell 产品说明书

#### ● 产品规格 (CAT#: EC2101)

C41(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

F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub> m<sub>B</sub>) gal dcm (DE3)pLysS Cam<sup>R</sup>

#### ● 产品说明

OverExpress C41(DE3)菌株起源于 BL21(DE3), 其优点是可以高效表达毒性蛋白或疏水性蛋白。OverExpress C41(DE3)跟 BL21(DE3)的区别在于其基因组含有至少一个未知突变, 这个未知突变使其获得了高效表达毒性蛋白的能力, 此突变位点参与大肠杆菌表达毒性蛋白时的细胞死亡途径。将具有氯霉素抗性的 pLysS 质粒导入 OverExpress C41(DE3)细胞中即是 C41(DE3) pLysS, pLysS 表达 T7 溶菌酶, T7 溶菌酶可以与 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, 非常适合毒性蛋白的原核表达。C41(DE3) pLysS 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), 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。C41(DE3)pLysS 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 >1×10<sup>8</sup> cfu/μg DNA。

#### ● 操作方法

1. C41(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 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。

### ● 自诱导培养基（唯地货号：AIM1016L）优点：

1. 不需添加任何 IPTG 或相关诱导物，节约成本，消除了 IPTG 毒性。
2. 不需要监控菌液密度，省时省力，尤其适合大规模筛选。
3. 细菌生长密度高于 IPTG 诱导表达系统，通常是 IPTG 诱导系统的 1-2 倍。
4. 蛋白表达量高于 IPTG 诱导表达系统，一般为 IPTG 诱导系统的 1.5-3 倍。
5. 诱导前本底表达极低或无表达，特别适合毒性基因的表达。

### ● 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. 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. C41(DE3)pLysS 菌株携带 pLysS 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。