



产品信息：

组成	BC217-01
W3110(DE3)	20×100μl
pUC19 质粒	5μl

储存条件： -70℃保存，避免反复冻融。

产品说明：

W3110(DE3)来源于 K-12 菌株，细菌的染色体 DNA 上整合了 T7 RNA 聚合酶(T7RNAP)表达框原件，T7RNAP 位于 lacUV5 启动子下，可表达 T7 RNA 聚合酶。pET、pGEX、pMAL 等原核表达载体可使用该菌株进行外源重组蛋白的表达。W3110(DE3)感受态细胞由特殊工艺制作，pUC19 质粒检测转化效率大于 1×10^6 cfu/μg DNA。

基因型： F^λ-rph-11NV(rrnD, rrnE)(lacUV5::T7 polymerase)(Cam^R)

菌株抗性： 对氨苄青霉素、卡那霉素、壮观霉素、链霉素、庆大霉素和四环素敏感。

质粒转化步骤：

1. 将感受态细胞置于冰水浴中化冻。待细胞刚化冻后，加入质粒 DNA 或 5-10μl 连接产物到细胞中，用手指拨打管底，轻轻混匀；
 2. 冰水浴中放置 30 分钟，不要晃动；
 3. 42℃热击 60 秒钟，不要晃动；
 4. 冰水浴中放置 2 分钟，不要晃动；
 5. 加入 500μl 无菌的 SOC 或 LB 培养基；
 6. 置于 37℃摇床中，150-200rpm 震荡复苏培养 60 分钟；
 7. 取 50-100μl 菌液涂布在含有抗性的 LB 平板上。待液体吸干后，倒置平板，37℃培养 12-16 小时。
(平板划线分离法：复苏培养结束后，12000rpm 离心 30 秒钟，弃掉上清，留 100μl 左右的液体，用 200μl 吸头轻轻吹打散菌块，取10μl 重悬的菌液分多点滴在平板上，倾斜吸头，用吸头头部的侧面将滴在平板上的液体来回划线。这个方法可以获得更多更大的单克隆菌落。)
- (质粒快速转化步骤：将步骤 2 的时间缩短到 5 分钟，对于氨苄青霉素抗性的质粒，步骤 4 完成后，可直接涂布或划线于含氨苄青霉素抗性的 LB 平板上。其它抗性的质粒仍需 60 分钟的复苏培养。)

蛋白表达步骤：

1. 挑取单菌落，接种到含 5ml 带抗生素的 LB 培养基中；
2. 37℃，200rpm 震荡培养细菌至对数生长期 (OD₆₀₀=0.4-0.8)；
3. 加入 IPTG 到终浓度为 0.4mM，37℃诱导 2-4 小时或 16℃诱导过夜；
4. 诱导完成后，离心收集菌体，用合适的方法 (如考马斯亮蓝染色法，Western-Blot 法或酶活性分析法) 分析菌体裂解物的总蛋白、上清和沉淀组分，明确表达产物的表达状况 (可溶性或不溶性表达)；
5. 大量表达时，可用 10ml 过夜培养物转接到 1L 培养基中，当培养到 OD₆₀₀=0.4-0.8 时，加入终浓度为 0.4mM 的 IPTG，37℃诱导 2-4 小时或 16℃诱导过夜 (不同蛋白表达的最佳条件有所不同，需在实验中优化。)