



Lemo21(DE3) 感受态细胞

产品信息:

组成	BC222-02
Lemo21(DE3) Competent cells	20×100μl
pUC19 质粒	5 μl

储存条件: -70°C保存, 避免反复冻融。

产品介绍:

Lemo21 (DE3) 是一种 T7 可控表达菌株, 由 BL21(DE3)改造而来, 用于表达具有挑战性的蛋白质, 包括膜蛋白、毒性蛋白质和具有溶解性问题的蛋白质。菌株中含有氯霉素抗性的 pLemo-lysY 质粒, T7 溶菌酶(Lys Y)的表达水平由 L-鼠李糖启动子控制, 不同浓度的 L-鼠李糖诱导产生不同浓度的 T7 溶菌酶, T7 溶菌酶是 T7 RNA 聚合酶的天然抑制物, 调节 T7 RNA 聚合酶活性, 从而实现对外源基因的精确表达调控。Lemo21 (DE3) 在没有 L-鼠李糖的情况下生长时, 该菌株的表现与含有 pLysS 的 BL21(DE3)菌株相同, 也非常适合于常规蛋白质的表达。fhuA2 突变赋予菌株抗 T1 噬菌体感染。Lemo21 (DE3) 大肠杆菌感受态细胞经特殊工艺制作, pUC19 质粒检测转化效率大于 10⁶ cfu/μg。

基因型:

fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm]ΔhsdS/ pLemo(CamR) λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-Bint::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Anin 5pLemo = pACYC184-PrhaBAD-lysY

菌株抗性: 对氨基青霉素, 壮观霉素, 卡那霉素, 链霉素和四环素敏感, 对氯霉素有抗性。

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 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°C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 500 μl 无菌的 SOC 或 LB 培养基。
- 6.置于 37°C摇床中, 150-200 rpm 震荡复苏培养 60 分钟。
- 7.取 50-100 μl 菌液涂布在含 30 μg/ml 的氯霉素和转化质粒抗性抗生素的 LB 平板上。待液体吸干后, 倒置平板, 37°C培养 12-16 小时。
(平板划线分离法: 复苏培养结束后, 12,000 rpm 离心 30 秒钟, 弃掉上清, 留 100 μl 左右的液体, 用 200 μl 吸头轻轻吹散菌块, 取 10 μl 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。)

蛋白表达步骤:

- 1.挑取单菌落, 接种到含 5ml 含抗生素 (30 μg/ml 的氯霉素和转化质粒抗性抗生素) 的 LB 培养基中过夜培养。
- 2.第 2 天用 0.1 ml 过夜培养物 (1:50 比例接菌) 接种到 5 ml 含抗生素的 LB 培养液中。同时添加不同浓度的 L-鼠李糖。例如, 使用浓度为 0、100、250、500、750、1000 和 2000 μM 的 L-鼠李糖。
- 3.30°C, 200 rpm 震荡培养细菌至对数生长期 (OD₆₀₀=0.4-0.8)。
- 4.每管中加入 IPTG 到终浓度为 0.4 mM, IPTG 浓度不应该变化, 只有 L-鼠李糖浓度变化。在 30°C下诱导 5 小时至过夜。
- 5.诱导完成后, 离心收集菌体, 用合适的方法 (如考马斯亮蓝染胶法, 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, 明确产物的表达状况 (可溶性或不溶性表达)。
- 6.表达膜蛋白时, 应通过细菌破碎仪、细胞破坏或超声处理 (与 EDTA 溶菌酶处理相结合) 破坏细胞后的低速旋转上清液中。如果目标蛋白的很大一部分是不溶性的, 则在较低的温度 (30°C) 下重复表达。膜蛋白表达可以在早期培养物 (OD₆₀₀=0.4) 时进行诱导, 并可通过在 20°C-25°C下来改善表达。
- 7.大规模诱导培养, 制备 1 升含有抗生素的液体培养基, 并在小规模试验中确定 L-鼠李糖的最佳水平。用新生长的菌落或 10 毫升新生长的培养物接种。在 30°C 下培养, 直到 OD₆₀₀ 达到 0.4-0.8。加入 400 μM IPTG, 使用小规模试验中确定的最佳时间/温度表达蛋白质。不同蛋白表达的最佳条件有所不同, 需在实验中优化。

20240620