



# NiCo21(DE3) 感受态细胞

## 产品信息:

组成	BC224-02
NiCo21(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:

NiCo21(DE3)菌株来源于 BL21(DE3), 具备 BL21(DE3)菌株的一切特点。推荐用于需要通过金属亲和介质 IMAC (如镍柱, Ni-NTA 或 Ni-IDA 等) 分离重组 His 标签蛋白的表达。His 标签蛋白纯化过程中经常会被大肠杆菌内源性金属结合蛋白污染。NiCo21(DE3)菌株通过基因工程技术改造 4 种内源性金属结合蛋白 SlyD(28KDa)、GlmS(67KDa)、ArnA(74KDa)和 Can(25KDa), 最大限度地减少纯化过程中这类蛋白对 His 标签蛋白的污染。经过突变的 GlmS 蛋白不能与 IMAC 介质结合, 其他三种蛋白质 (SlyD、ArnA 和 Can) 被标记上 CBD (Chitin Binding Domain) 标签, 经 IMAC 介质纯化后, 再通过几丁质亲和介质层析便可快速去除, 最终获得高纯度的 His 标签蛋白。fluA2 突变赋予菌株抗 T1 噬菌体感染特性。NiCo21(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 10<sup>6</sup>cfu/μg。

## 基因型:

*can::CBD fluA2 [lon] ompT gal (λ DE3)[dcm] arnA::CBD slyD::CBD glmS6Ala ΔhsdS λ DE3= λ sBamHI ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1)i21 Δnin5*

**菌株抗性:** 对氨苄青霉素、壮观霉素、卡那霉素、链霉素、四环素和氯霉素敏感。

## 转化步骤:

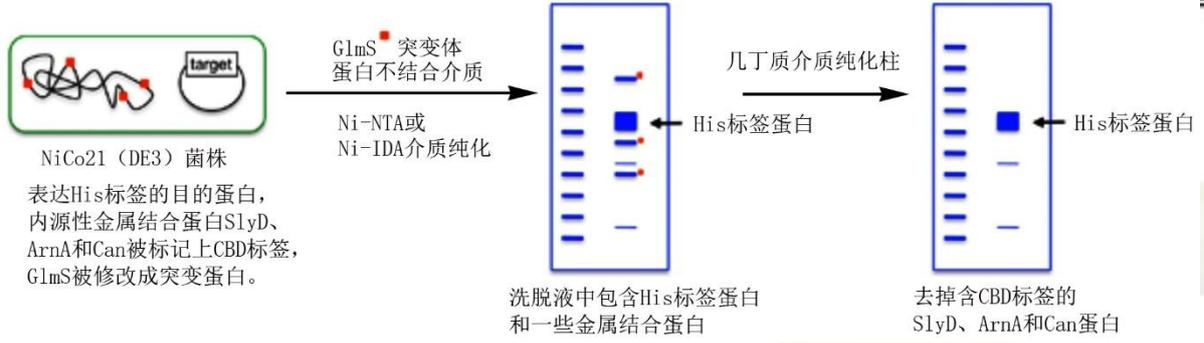
1. 将感受态细胞置于冰水浴中化冻。待细胞刚化冻后, 加入质粒 DNA 到细胞中, 用手指拨打管底, 轻轻混匀。
2. 冰水浴中放置 30 分钟, 不要晃动。
3. 42°C 热击 60 秒钟, 不要晃动。
4. 冰水浴中放置 2 分钟, 不要晃动。
5. 加入 500 μl 无菌的 SOC 或 LB 培养基。
6. 置于 37°C 摇床中, 150-200 rpm 震荡复苏培养 60 分钟。
7. 取 50-100 μl 菌液涂布在适当浓度的转化质粒的抗性抗生素的 LB 平板上。待液体吸干后, 倒置平板, 37°C 培养 12-16 小时。  
(平板划线分离法: 复苏培养结束后, 12,000rpm 离心 30 秒钟, 弃掉上清, 留 100 μl 左右的液体, 用 200 μl 吸头轻轻吹打散菌块, 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。)

## 重组蛋白表达步骤:

1. 挑取单菌落, 接种到含 5 ml 带抗生素的 LB 培养基中。
2. 37°C, 200 rpm 震荡培养细菌至对数生长期 (OD<sub>600</sub>=0.4-0.8)。
3. 加入 IPTG 到终浓度为 0.4 mM, 37°C 诱导 2-4 小时或 16°C 诱导过夜。  
(低温诱导方法: 37°C, 200 rpm 震荡培养细菌到 1-2 个 OD 左右, 然后将培养物降温至 16-20°C, 低温培养 15 分钟达到平衡, 将 IPTG 添加到摇瓶中, 最终浓度达到为 0.1-0.5 mM 之间。继续诱导培养 12-24 小时。)
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 10 ml 过夜培养物转接到 1L 培养基中, 当培养到 OD<sub>600</sub>=0.4-0.8 时, 加入终浓度为 0.4 mM 的 IPTG, 37°C 诱导 2-4 小时或 16°C 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)。



在 NiCo21 (DE3) 菌株中表达的 His 标签目标蛋白的两步纯化方法



20240620