



ArcticExpress(DE3) pRARE2 感受态细胞

产品信息:

组成	BC226-02
ArcticExpress(DE3) pRARE2 Competent cells	20×100μl
pUC19 质粒	5 μl

储存条件: -70°C保存, 避免反复冻融。

产品说明:

ArcticExpress(DE3) pRARE2 细胞来源于 BL21-Gold 菌株, 缺乏细胞质蛋白酶 Lon 和外膜蛋白酶 OmpT。庆大霉素抗性的质粒能稳定表达海洋细菌 *Oleispira antarctica* 的两个低温分子伴侣 Cpn10 (~10 kDa) 和 Cpn60 (~57 kDa)。这些伴侣蛋白在较低温度 (4-12°C) 下, 比大肠杆菌 GroEL/GroES 表现出更高的活性, 可促进重组蛋白的正确折叠, 增加重组蛋白的可溶性、产量和活性。该菌株的λ噬菌体 DE3 基因区, 可表达 T7 RNA 聚合酶, 适用于含有 T7 启动子的原核表达载体 (如 pET 等) 和非 T7 启动子的表达载体 (如 pGEX、pMal, pTrc 等载体) 的高效表达。该菌株又携带 pRARE2 质粒, 可补充大肠杆菌缺乏的 7 种稀有密码子(AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA 和 CGG)对应的 tRNA, 提高外源基因的表达水平。 ArcticExpress(DE3) pRARE2 感受态细胞由特殊工艺制成, pUC19 质粒检测转化效率大于 1×10^7 cfu/μg DNA。

基因型: *F⁻ ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) dcm⁺ Tetr gal λ(DE3) endA Hte [cpn10cpn60 Gent^R] pRARE2 (Cam^R)*。

菌株抗性: 具有庆大霉素、四环素、氯霉素抗性。对氨基青霉素、卡那霉素、壮观霉素敏感。

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 5-10 μl 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°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, 12,000 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 5 ml 的含 20 μg/ml 庆大霉素, 30 μg/ml 的氯霉素以及用于选择表达质粒的合适的抗生素的 LB 培养基中。37°C, 200-250 rpm 震荡培养细菌过夜。
2. 次日, 将培养物 100 μl 转移到 5 ml 培养基中。在 30°C 下培养, 并以 220-250 rpm 的转速振荡, 培养细菌到 OD₆₀₀=0.5-1。
3. 将培养物转移至 10-13°C 的摇床, 或调整温度到 10-13°C, 并在 220-250 rpm 的转速下振荡培养, 让培养物平衡至 10-13°C 至少 15 分钟后, 向试管中加入最终浓度为 1 mM 的 IPTG 进行诱导。在 10-13°C 条件下, 以 220-250 rpm 的转速振荡诱导培养 24 小时。(IPTG 终浓度和诱导培养时间应蛋白不同需要优化。)
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 1 L 培养基中, 当培养到 OD₆₀₀=0.4-0.8 时, 加入 IPTG, 10-13°C 诱导 24h 过夜。不同蛋白表达的最佳条件有所不同, 需在实验中优化。