

Rosetta-gami(DE3)pLysS Chemically Competent Cell

产品说明书

● 产品规格 (CAT# : EC1011)

Rosetta-gami(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

$\Delta(ara-leu)7697 \Delta lacX74 \Delta phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL(DE3) F' [lac^+ lacI^q pro] gor522::Tn10$
 $trxB::kan pLysSRARE (Cam^R, Str^R, Tet^R)$

● 产品说明

Rosetta-gami(DE3)pLysS 菌株聚合了不同原核表达菌株的优势:

- * Rosetta-gami 赋予其 Rosetta 和 Origami 的优点——补充大肠杆菌缺乏的 6 种稀有密码子(AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA)对应的 tRNA, 提高外源基因的表达水平, 并且包含突变的硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase) (trxB) 和谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase) (gor)基因, 它们是还原途径的两个关键酶, 其突变有利于高效形成正确折叠的含有二硫键的蛋白, 增强蛋白的可溶性。
- * 该菌株染色体整合了 λ 噬菌体 DE3 区 (DE3 区含有 T7 噬菌体 RNA 聚合酶)适合 T7 启动子诱导的蛋白表达。
- * 该菌株携带的 pLysS 质粒含有表达 T7 溶菌酶的基因, 能够降低目的基因的背景表达水平, 但不干扰 IPTG 诱导的表达, 适合表达毒性蛋白和非毒性蛋白。Rosetta-gami(DE3)pLysS 菌株具有卡那霉素, 氯霉素, 链霉素, 四环素抗性, 为亮氨酸生长缺陷型菌株。Rosetta-gami(DE3)pLysS 感受态细胞由特殊工艺制作, pUC19 质粒 (2686bp, Amp^R) 检测转化效率 $>10^7$ cfu/µg DNA。

● 操作方法

1. Rosetta-gami(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, 迅速放回冰上并静置 2 分钟, 晃动会降低转化效率。
3. 向离心管中加入 700 µl 不含抗生素的无菌培养基 (2YT 或 LB), 混匀后 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 (唯地 CAT# : CM1018L)、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。以质粒 pet32a 为例：在 TB 营养液中过夜培养的菌体浓度约为 LB 的 3-5 倍，SOB 的 2-3 倍。
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。

● 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. 混入质粒时应轻柔操作，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. Rosetta-gami(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。
6. 具有卡那霉素抗性，不能用于具有卡那霉素抗性质粒的表达。