

ClearColi BL21(DE3) Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT# : EC2200)

ClearColi BL21(DE3) Competent Cell	100µl /支	保存: -80°C (6个月)
pUC19 (control vector, 10pg/µl)	10µl	保存: -80°C (12个月)

● 基因型

F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lon λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) msbA148 ΔgutQ ΔkdsD ΔlpxL ΔlpxM ΔpagP ΔlpxP ΔeptA

● 产品说明

ClearColi BL21(DE3)来源于 BL21(DE3), 在 BL21(DE3)中引入 8 个独立基因突变, 导致 ClearColi BL21(DE3)细胞壁外层的脂多糖 (LPS) 被修饰:LPS 的低聚糖链被删除, 同时 LPS 的两个酰基链也被删除, 破坏了 ClearColi BL21(DE3)大肠杆菌的内毒素信号通路; 正常的 LPS 含有六个酰基链, 含有六个酰基链的 LPS 可以被受体 TLR4 识别, 激活内毒素反应, 而只含有四个酰基链的 LPS 不能被 TLR4 识别, 因此不触发内毒素反应。从 ClearColi BL21(DE3)细胞中提取的蛋白或质粒 DNA 中的内毒素含量极低, 提取的无内毒素蛋白或多肽广泛应用于哺乳动物试验, 疾病治疗等。ClearColi BL21(DE3)同时为 Lon 蛋白酶和膜外蛋白酶 OMPT 的缺陷型菌株, 这两种酶的缺失有效防止异源蛋白在大肠杆菌体内的降解, 提高了目标蛋白的稳定性和表达量。λ 噬菌体 DE3 区含有 T7 噬菌体 RNA 聚合酶, 该区整合于 ClearColi BL21(DE3) 的染色体上, 可同时表达 T7 RNA 聚合酶和大肠杆菌 RNA 聚合酶, 用于 pET 系列, pGEX, pMAL 等质粒的蛋白表达。ClearColi BL21(DE3)感受态细胞由特殊工艺制作, pUC19 质粒 (2686bp, Amp^R) 检测转化效率>10⁷ cfu/µg DNA。

● 操作方法

注意: ClearColi BL21(DE3)的细胞壁被破坏, 对渗透压敏感, 培养基中一般要求含有 1%的氯化钠, 可用高盐浓度的 LB Miller 配方(Tryptone 10g, Yeast Extract 5g, NaCl 10g), 不可用 SOB、2YT 等低盐培养基。

1. ClearColi BL21(DE3)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 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相应抗生素的 LB 培养基上。
5. 将平板倒置放于 37°C培养箱过夜培养 36 小时(ClearColi BL21(DE3)菌株生长缓慢, 需延长培养时间)。

● 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 (唯地 CAT#: CM1010L) 培养基，接入一个含有目的质粒的新鲜单菌落。
2. 37°C, 200 rpm 过夜摇菌约 15-24h。
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 培养基中，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, 200 rpm 摇菌到 OD600 值为 0.5-0.8（一般需要 3-4h）。
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 1 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, 200 rpm 摇菌 3-6h。
（不同蛋白诱导的最佳温度/时间有差异，需实验者做梯度试验确定，常用的温度/时间组合有：37°C/3-6h、20°C/12-24h、16°C/12-30h、12°C/12-48h）。
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。

● 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，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。
2. ClearColi BL21(DE3)的细胞壁被破坏，对渗透压敏感，培养基中一般要求含有 1%的氯化钠，可用高盐浓度的 LB Miller 配方(Tryptone 10g, Yeast Extract 5g, NaCl 10g)，不可用 SOB、2YT 等低盐培养基。
3. 培养基中最好不要含有 Mg²⁺和 Ca²⁺，这两种离子会抑制 ClearColi BL21(DE3)生长
4. ClearColi BL21(DE3)菌株生长缓慢，生长速度约为普通 BL21(DE3)的 1/2，固体培养或液体摇菌时均需适当延长培养时间，为了获得最佳的诱导蛋白可同时增加液体培养基的溶氧。
5. ClearColi BL21(DE3)容易聚集，特别是在菌体生长后期容易聚集成团，测 OD 值时需用枪吹打使其分散。
6. 诱导时，IPTG 浓度可选择浓度，0.1-2 mM 均可，最佳诱导时间，温度，IPTG 浓度需实验者优化。