

### Rosetta(DE3) 96-well plates

### Chemically Competent Cell 产品说明书

EC-96/8 系列产品为 96 孔板/8 连管包装感受态, 除以下产品规格外, 可根据客户需求定制感受态体积和包装形式

#### ● 产品规格和内容:

包装名称	货号	包装数量×含量	保存条件/保质期
无裙边 96 孔板感受态	CAT#: EC-96NA1010	96×100ul	-80°C/6 个月
半裙边 96 孔板感受态	CAT#: EC-96H1010	96×100ul	-80°C/6 个月
带裙边 96 孔板感受态	CAT#: EC-96W1010	96×100ul	-80°C/6 个月
96 孔圆孔圆底深孔板 (1.2ml) 感受态	CAT#: EC-9612RDW1010	96×100ul	-80°C/6 个月
96 孔圆孔圆底深孔板 (2ml) 感受态	CAT#: EC-9620RDW1010	96×100ul	-80°C/6 个月
96 孔方孔圆底深孔板 (1.2ml) 感受态	CAT#: EC-9612SDW1010	96×100ul	-80°C/6 个月
96 孔方孔圆底深孔板 (2.2ml) 感受态	CAT#: EC-9622SDW1010	96×100ul	-80°C/6 个月
八连管感受态	CAT#: EC-8ST1010	8×100ul	-80°C/6 个月

#### ● 基因型

*F<sub>ompT</sub> hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub>m<sub>B</sub>) gal dcm(DE3) pRARE(argU, argW, ilex, glyT, leuW, proL) (Cam<sup>R</sup>)*

#### ● 产品说明

Rosetta(DE3)菌株具有氯霉素抗性, 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, 尤其是真核基因在原核系统中的表达水平, 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), 同时表达 T7 RNA 聚合酶和大肠杆菌 RNA 聚合酶, 可用于 pET 系列, pGEX, pMAL 等质粒的蛋白表达。Rosetta(DE3)感受态细胞由特殊工艺制作, pUC19 质粒 (2686bp, Amp<sup>R</sup>) 检测转化效率>10<sup>9</sup> cfu/μg DNA。

#### ● 热激转化操作方法(90min)

1. Rosetta(DE3)感受态细胞从-80°C拿出, 迅速插入冰中, 2 分钟后待菌块融化, 加入目的 DNA (质粒或连接产物) 并用移液器轻轻吸打混匀, 冰中静置 25 分钟。
2. 42°C 水浴热激 45 秒, 迅速放回冰中, 静置 2 分钟, 晃动会降低转化效率。
3. 向离心管中加入适量不含抗生素的无菌培养基 (2YT 或 LB), 混匀后 37°C, 200-500 rpm 复苏 60 分钟。
4. 5000 rpm 离心 30S, 收集菌体, 留取适量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/LB 培养基上。
5. 将平板倒置放于 37°C 培养箱过夜培养。

### ● 快速转化操作方法 (10min)

1. 提前 15 分钟将用到的筛选培养基平板拿到 37°C 预热。
2. 感受态细胞从 -80°C 拿出，迅速插入冰中，2 分钟后待菌块融化，加入目的 DNA（质粒或连接产物）并用移液器轻轻吸打混匀，冰中静置 ≥ 5 分钟。
3. 将感受态细胞-DNA 混合物转移到已经 37°C 预热的 LB 培养基上，涂均匀，表面无水渍，将平板倒置放于 37°C 培养箱过夜培养。

● 注意：感受态细胞用快速转化方法涂氨苄/羧苄青霉素抗性平板时效率较高，若涂卡那霉素或其他抗生素平板，转化效率下降(因无孵育步骤，卡那霉素等对菌体毒性较大)。若要提高卡那霉素或其他抗性质粒的转化效率，可增加孵育步骤：37 度孵育 30-60min。

### ● 快速热激转化操作方法 (25min, 可提高转化效率)

1. 感受态细胞从 -80°C 拿出，迅速插入冰中，2 分钟后待菌块融化，加入目的 DNA (质粒或连接产物)并用移液器轻轻吸打混匀，冰中静置 5 分钟。
2. 42°C 水浴热激 45 秒，迅速放回冰中，静置 2 分钟 (晃动会降低转化效率)。加入适量不含抗生素的 2YT/LB，37°C，200-500 rpm 复苏 10 分钟，涂板 (涂均匀，表面无水渍)。
3. 将平板倒置放于 37°C 培养箱过夜培养。

### ● 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，混入目的 DNA 时应轻柔操作。
2. 快速转化感受态细胞涂氨苄/羧苄青霉素抗性平板时效率较高，若涂卡那霉素或其他抗生素平板，转化效率下降(因无孵育步骤，卡那霉素等对菌体毒性较大)。若要提高卡那霉素或其他抗性质粒的转化效率，可增加孵育步骤：37 度孵育 30-60min。
3. 转化高浓度的质粒或高效率的连接产物可相应减少最终用于涂板的菌量。
4. 也可在复苏步骤后直接加入自诱导培养基 (AIM-2YT Broth 唯地 CAT#: AIM1016L)，进行目标蛋白的诱导。