



Tuner(DE3)感受态细胞

产品信息:

组成	BC211-01	BC211-02
Tuner(DE3)	10×100μl	20×100μl
pUC19 质粒	5μl	5μl

储存条件: -70℃ 保存，避免反复冻融。不适合在液氮中保存。

产品介绍:

Tuner(DE3)为 LacYZ 突变型 BL21(DE3)菌株。Tuner(DE3)菌株可利用 IPTG 的加入量来精准地控制重组蛋白的表达量，与 pET 系列载体联合使用，可以使得蛋白表达从低表达水平到高表达水平进行有效调控（使用低浓度的 IPTG 诱导重组蛋白低水平表达时，目的蛋白可能会具有更好的可溶性和生物活性）。该菌株含有λ噬菌体 DE3 区，可以表达 T7 RNA 聚合酶。Tuner(DE3)菌株属于 B 菌株，lon 和 ompT 蛋白酶缺陷型。Tuner(DE3)感受态细胞由特殊工艺制成，pUC19 质粒检测转化效率达 10^7 cfu/μg DNA。

基因型: *F⁻ompT hsdSB (rB⁻mB⁻) gal dcmlacY1* (DE3)

菌株抗性: 对氨苄青霉素，卡那霉素，氯霉素和四环素敏感。

质粒转化步骤: (以氨苄青霉素抗性的 pET 质粒为例)

1. 将感受态细胞置于冰水浴中化冻。待细胞刚化冻后，加入 1-5μl 含有 1-100ng 的质粒 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℃ 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 500μl 的室温的 SOC 或 LB 培养基。
6. 置于 37℃ 摇床中，150-200rpm，复苏培养 60 分钟。
7. 取 50-100μl 菌液涂布在含有氨苄青霉素抗性的 LB 平板上。待液体吸干后，倒置平板 37℃ 培养 12-24 小时。

(平板划线分离法: 复苏培养结束后，12000rpm 离心 30 秒钟，弃掉上清，留 100μl 左右的液体，用 200μl 吸头轻轻吹打散菌块，取 10μl 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大的单克隆菌落)。

蛋白表达步骤:

1. 挑取单菌落，接种到含 5ml 带抗生素的 LB 培养基中。
2. 37℃，200rpm 震荡培养细菌至对数生长期 ($OD_{600}=0.4-0.8$)。
3. 加入 IPTG 到终浓度为 0.4mM，37℃ 诱导 4 小时或 16℃ 诱导过夜。（可以设定不同浓度的 IPTG 来诱导表达）
4. 诱导完成后，离心收集菌体，用合适的方法（如考马斯亮蓝染色法，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. 重组蛋白大量表达时，可用 10ml 过夜培养物转接到 1L 培养基中，当培养到 $OD_{600}=0.4-0.8$ 时，加入终浓度为 0.4mM 的 IPTG，37℃ 诱导 4 小时或 16℃ 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）。

BM190911