



ClearColi BL21(DE3) 感受态细胞

产品信息:

组成	BC215-01
ClearColi BL21(DE3) Competent Cells	10×100μl
pUC19 (0.1ng/μl)	5μl

储存条件: -70℃保存, 避免反复冻融。

产品介绍:

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是几乎所有革兰氏阴性细菌外膜的一种成分。LPS 被哺乳动物免疫细胞上的 TLR4/MD-2 识别, 从而激活 NF-kappB 信号通路, 导致生物体炎症反应的发生。大肠杆菌基因工程产品中的残留的 LPS 会极大地影响下游实验。ClearColi 系列大肠杆菌的细菌外膜上为修饰后的类脂 IVA(Lipid IVA), 与野生型的 LPS 相比, 缺乏寡糖链和两条二级酰基链, 类脂 IVA 不能诱导活化的 hTLR4/MD-2 复合物的形成, 避免了 LPS-TLR4/NF-kB 信号通路的内毒素反应。此外, 不含寡糖的类脂 IVA 更易从重组蛋白中去除。

ClearColi BL21 (DE3) 细胞的生长速度约为正常 BL21 (DE3) 细胞的 50%。转化后的菌落在最初 24 小时内显得非常小。建议转化后的平板先培养皿培养 36-48 小时实验再挑菌落进行实验。诱导前, 需要更长的生长时间才能达到所需的细胞密度。

pUC19 质粒检测感受态细胞的转化效率大于 10^5 cfu/μg。

基因型: F- ompT hsdSB (rB - mB -) gal dcm lon λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) msbA148 ΔgutQ ΔkdsD ΔlpxL ΔlpxM ΔpagP ΔlpxP ΔeptA

产品特点:

用于表达低内毒素的重组蛋白。该菌株含有 T7 RNA 聚合酶和大肠杆菌 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)在原核系统中的高效表达。

菌株抗性: 对氨苄青霉素, 卡那霉素, 壮观霉素, 氯霉素, 链霉素和四环素敏感。

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, 加入目的质粒到细胞中, 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 无菌的 LB 培养基;
6. 置于 37℃摇床中, 150-200rpm 震荡复苏培养 60 分钟;
7. 取 100-200 μl 左右的菌液, 涂布于含相应抗生素的 LB 平板上, 倒置放于 37℃培养箱培养 36-48 小时。

蛋白质诱导方案:

1. 从平板上挑取一个生长良好的单菌落接种到 10 ml 含有合适抗生素的液体 LB 培养液中。
2. 37°C, 200-250 rpm 振荡培养过夜。
3. 无菌条件下, 接种 8 ml 过夜培养液到 200 ml 含有适当抗生素的 LB 培养液中。或者通过测量 OD600 的方法来决定接种量, 最终 OD600 在 0.1 左右为宜。
4. 37°C, 200-250rpm 振荡培养, 直到 OD600 达到 0.6-0.8 (约 4-5 小时)。
5. 添加 IPTG 至最终浓度为 0.4-1 mM 进行蛋白的诱导表达。(通过溶解制备 1 M IPTG 溶液将 2.38 g IPTG 放入水中, 并将最终体积调节至 10 mL。使用前过滤灭菌)。为了确定 IPTG 诱导的最佳浓度, 最大限度地表达目标蛋白, 可以用 IPTG 梯度测试使用浓度。
6. 37°C下振荡诱导培养 3-4 小时。为了确定目标蛋白质诱导的最佳时间, 建议进行时程实验, 诱导时间 2-16 小时。
7. 诱导结束后, 5,000×g 离心 10 分钟收集细胞。
8. 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)。
9. 根据表达结果和目的蛋白质的特点制定合适的蛋白质纯化方案。

注意事项:

1. ClearColi BL21(DE3)菌株生长缓慢, 平板在 37°C培养, 时间在 36-48 小时之间。
2. ClearColi BL21(DE3) 细胞外膜中为修饰后的脂质 IVA, 适合在高盐培养基中生长, 常用 LB 培养基, 不能用 SOB, 2×YT 和 SOC 等培养基。
3. 感受态细胞应该在冰水浴中化冻, 加入 DNA 后应轻柔混匀, 加入 DNA 的体积小于细胞体积的 1/10。