

ArcticExpress (DE3) 感受态细胞

ArcticExpress (DE3) Chemically Competent Cell

保存条件: -80°C

基因型

E. coli B F⁻ ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) dcm⁺

TetR gal λ (DE3) endA Hte [cpn10cpn60 GentR]

简要说明

ArcticExpress (DE3)来源于 E. coli B, 为 Lon 和 OmpT 蛋白酶缺陷型菌株, 可促进表达蛋白的稳定。

ArcticExpress (DE3)菌株染色体 DNA 中整合了 λ 噬菌体 DE3 区, 使得 ArcticExpress (DE3)菌株可同时表达 T7 RNA 聚合酶和大肠杆菌 RNA 聚合酶, 广泛用于 pET 系列, pGEX, pMAL 等质粒的蛋白表达。ArcticExpress (DE3) 菌株具有四环素, 庆大霉素抗性, endA1 突变有利于质粒 DNA 的稳定。[cpn10cpn60 GentR] 的存在使 ArcticExpress (DE3)可以表达适应低温的伴侣蛋白 Cpn10 和 Cpn60 (来自嗜冷菌—*Oleispira antarctica*)。

Cpn10 和 Cpn60 伴侣蛋白在 4-12 $^{\circ}\text{C}$ 表现出较高活性, 在 ArcticExpress (DE3)细胞中表达时, 可降低重组蛋白包涵体的形成, 增加可溶重组蛋白的表达量及生物活性, 比传统的原核表达伴侣蛋白 GroEL、GroES 等具有更加优异的促融性能。ArcticExpress (DE3)感受态细胞经特殊工艺制作, pUC19 质粒检测转化效率达 108cfu/ μg DNA。

操作说明

1. ArcticExpress (DE3) 感受态细胞从 -80°C 拿出, 迅速插入冰中, 待菌块融化, 加入目的质粒, 并用手拨打 EP 管底混匀, 冰中静置 25 分钟。
2. 42 $^{\circ}\text{C}$ 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 LB 培养基, 混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$, 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 (平板中务必同时含有 34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的氯霉素, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的庆大霉素和转化质粒本身的筛选抗生素; 若质粒浓度较高, 也可稀释后涂板, 务必保证能在平板上挑到单克隆菌落)。
5. 将平板倒置放于 37 $^{\circ}\text{C}$ 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。
2. 转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。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 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的庆大霉素, 以防质粒丢失。
3. 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。
4. ArcticExpress (DE3)感受态细胞具有四环素、庆大霉素抗性, 不可用于具有四环素、庆大霉素抗性质粒的转化。

