Rosetta-gami B(DE3)

Rosetta-gami B(DE3) Chemically Competent Cell 说明书

产品货号： **ML-G27017**

保存条件： -80℃

产品规格： **10×100μl 50×100μl**

产品介绍

基 因 型

F- ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm lacY1 ahpC (DE3) gor522::Tn10 trxB pRA RE (Camr, Kanr, Tetr)

简 要 说 明

Rosetta-gami B(DE3) 菌株聚合了 BL21，Tuner，Origami 和 Rosetta 四种菌株的优点：

＊ lacY1 基因 (半乳糖苷透性酶基因)突变赋予其 Tuner 菌株的优点——IPTG 以均一速度进入体系中大肠杆菌的每个细胞，产生更加严格、均一的浓度依赖。

＊ pRARE 赋予其 Rosetta 菌株的优点——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，提高外源基因的表达水平。

＊ gor522::Tn10 trxB 赋予其 Origami 菌株的优点——突变的硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase) (trxB)和谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase) (gor)基因，它们是还原途径的两个关键酶，其突变有利于高效形成正确折叠的含有二硫键的蛋白，增强蛋白的可溶性。

＊ 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)适合 T7 启动子诱导的蛋白表达。

＊Rosetta-gamiB(DE3)菌株具有卡那霉素，氯霉素，四环素抗性，由特殊工艺制作，经 pUC19 质粒检测转化效率高达 108 cfu/μg DNA。

操 作 说 明

1. Rosetta-gami B(DE3)感受态细胞从-80℃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 管底混匀，冰中静置 25 分钟。

2. 42℃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 不含抗生素的无菌培养基（2YT 或 LB），混匀后 37℃， 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 2YT 或 LB 培养基上。

5.将平板倒置放于 37℃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. 混入质粒时应轻柔操作。

3. 转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。

4. 诱导时，IPTG 浓度可选（0.1-10 mM 均可）。

5.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。

Sample Induction Protocol (for reference only)

1. Inoculate a single colony from a freshly streaked plate into 3ml of LB medium containing the appropriate antibiotic for the plasmid and host strain.

2. Incubate with shaking at 200 rpm at 37℃ overnight.

3. Inoculate 50 ml of LB medium containing the appropriate antibiotic with 0.5 ml of the overnight culture prepared in step 2(use the 500 ml triangular flask as the container would be better).

4. Incubate with shaking at 150 rpm at 37℃ until the OD 600 reaches 0.5-0.8. (0.6 recommended; about 2.5h).

5. (Optional)Pipet 1ml of the cultures into clean microcentrifuge tubes and place the tubes on ice until needed for gel analysis or storage at -20℃. These will serve as the non-induced control samples.

6. Add IPTG to a final concentration of 1 mM. Optimal time for induction of the target protein may vary from 2-16 hours, depending on the protein.

7. Incubate with shaking at 120 rpm at 37℃ for 2-4 hours. To determine the optimal time for induction of the target protein, it is recommended that a time course experiment be performed varying the induction from 2-16 hours.

8. Place the culture on ice for 10 minutes. Harvest cells by centrifugation at 5,000 x g for 10

minutes at 4℃.

9. Remove the supernatant and store the cell pellet at -20℃ (storage at lower temperatures is also acceptable).

IPTG

Prepare a 1 M solution of IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactoside; Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) bydissolving 2.38 g of IPTG in dd water and adjust the final volume to 10 ml. Filter sterilize before use.