



# OverExpressC43(DE3)感受态细胞

## 产品信息:

组成	BC210-01	BC210-02
OverExpressC43(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:

OverExpressC43(DE3)菌株适用于毒性蛋白的表达，来源于OverExpressC41(DE3)菌株。OverExpress C41(DE3)是通过毒性蛋白在BL21(DE3)内过表达筛选实验得到的基因突变菌株，该菌株的基因突变降低了T7 RNA聚合酶的酶活性，下调毒性蛋白的表达量使细胞存活。OverExpress C43(DE3)菌株是通过另一个毒性蛋白对OverExpress C41(DE3)菌株再次进行毒性耐受性实验获得的，OverExpress C43(DE3)菌株比OverExpress C41(DE3)更加耐受毒性蛋白。OverExpress C43(DE3)菌株也可以表达常规蛋白，相同条件下，蛋白表达量略低于BL21(DE3)菌株。OverExpressC43(DE3)菌株属于B菌株，lon和ompT蛋白酶缺陷型。OverExpress C43(DE3)感受态细胞由特殊工艺制成，pUC19质粒检测转化效率可达 $1 \times 10^7$  cfu/μg DNA。

**基因型:** *F<sub>ompT hsdSB (rB<sup>mB</sup>) gal dcm</sub>* (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多更大的单克隆菌落。)

## 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