Rosetta-gami2(DE3) 感受态细胞

产品信息：

组成	BC214-01	BC214-02
Rosetta-gami 2(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：

Rosetta-gami2(DE3)是一种用于原核表达的菌株，具有 Rosetta 2 和 Origami2 两种菌株的优点。菌株中含有氯霉素抗性质粒 pRARE2，可以提供大肠杆菌缺乏的七种稀有密码子(AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA 和 CGG)对应的 tRNA，提高含稀有密码子的真核基因在原核系统中的表达。同时该菌株能够表达突变型硫氧还蛋白还原酶(TrxB)和谷胱甘肽还原酶(Gor)，帮助含二硫键的外源蛋白在细胞内的正确折叠和稳定，增强蛋白的可溶性。该菌株的基因组中含有λ噬菌体的DE3 区，可以表达 T7 RNA 聚合酶，适用于含 T7 启动子的pET 表达质粒。Rosetta-gami2(DE3)感受态细胞经特殊工艺制成，pUC19 质粒检测转化效率可达 10^7cfu/μg DNA。

基因型：

Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA Pvu II phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F'[lac+ lacIq pro] gor522::Tn 10 trxB pRARE2(Cam^R, Str^R, Tet^R)

菌株抗性：对氨苄青霉素，卡那霉素敏感。对氯霉素，四环素和链霉素有抗性。

质粒转化步骤：（以氨苄青霉素抗性的 pET 载体为例）

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 菌液涂布在含有抗性（100μg/ml 氨苄青霉素，34μg/ml 氯霉素，10μg/ml 四环素和 50μg/ml 链霉素）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。
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）。
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