



Rosetta-gami(DE3)pLysS Chemically Competent Cell

产品货号：BDC202-1

产品规格：100μl/支

基因型：

Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F'
[lac⁺ lacI^q pro] gor522::Tn10 trxB::kan pLysSRARE2 (Cam^R, Str^R, Tet^R)

产品介绍：

Rosetta-gami(DE3)pLysS 菌株聚合了不同原核表达菌株的优势：

- * Rosetta-gami 赋予其 Rosetta 和 Origami 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，并且包含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。
- * 该菌株携带的 pLysS 质粒含有表达 T7 溶菌酶的基因，能够降低目的基因的背景表达水平，但不干扰 IPTG 诱导的表达，适合表达毒性蛋白和非毒性蛋白。Rosetta-gami(DE3) pLysS 菌株具有卡那霉素，氯霉素，链霉素，四环素抗性，为亮氨酸生长缺陷型菌株。Rosetta-gami(DE3)pLysS 感受态细胞由特殊工艺制作，转化效率高达 10⁸ cfu/μg DNA。

操作方法：

1. Rosetta-gami(DE3)pLysS 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 DNA (质粒或连接产物) 并用手拨打 EP 管底轻轻混匀(避免用枪吸打)，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 700μl 不含抗生素的无菌培养基 (2YT 或 LB)，混匀后 37℃，200rpm 复苏 60 分钟。
4. 5000rpm 离心一分钟收菌，留取 100μl 左右上清轻轻吹打重悬菌块并涂布到含 34 μg/ml 氯霉素及所选质粒筛选抗生素的 2YT 或 LB 培养基上。
5. 将平板倒置放于 37℃ 培养箱过夜培养。

Sample Induction Protocol (for reference only)

1. Inoculate a single colony from a freshly streaked plate into 5 ml 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.
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°C for 3-4 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 × g for 10 minutes at 4°C.
9. Remove the supernatant and store the cell pellet at -20°C (storage at lower temperatures is also acceptable).

IPTG

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

氯霉素

Chloramphenicol 34 mg/ml in ethanol. Store at -20°C. Use at 34 µg/ml.

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(0.1-2mM 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。
6. BL21(DE3)pLysS 菌株携带 pLysS 质粒，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 34 µg/ml 氯霉素，以防质粒丢失。
7. 具有卡那霉素抗性，不能用于具有卡那霉素抗性质粒的表达。

保存条件：

-80°C保存 6 个月。