



## Rosetta-gami(DE3)pLysS Chemically Competent Cell 产品说明书

### 产品规格 (CAT#: YC212)

Rosetta-gami(DE3)pLysS :	100μl/支
pUC19 (control vector, 0.1ng/μl):	5μl
保存条件(保质期) :	-80°C (6个月)

### 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, pUC19 质粒检测转化效率高达  $10^7$  cfu/μg DNA。

**基因型 :**  $\Delta(ara-leu)7697 \Delta lacX74 \Delta phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL(DE3) F'$   
 $[lac^+ lacI^q pro] gor522::Tn10 trxB::kan pLysSRARE2 (Cam^R, Str^R, Tet^R)$

### 操作方法

- 1.取感受态细胞置于冰浴中(解冻 1-2 分钟), 加入目的 DNA, 轻轻混匀, 在冰浴中放置 25 分钟。  
注意: 所使用 DNA 体积不要超过感受态细胞体积的 1/10。
- 2.将离心管置于 42°C 水浴中放置 60 秒, 然后快速将管转移到冰浴中, 使细胞冷却 2 分钟, 该过程不要摇动离心管。
3. 向每个离心管中加入 700μl 无菌的 SOC 或 LB 培养基(不含抗生素), 混匀后置于 37°C 180rpm 摇床振荡培养 45-60 分钟, 目的是使质粒上相关的抗性标记基因表达, 使菌体复苏。
4. 根据实验要求, 吸取适量体积已转化的感受态细胞加到含相应抗生素的 SOC 或 LB 固体琼脂培养基上, 将细胞均匀涂开。将平板置于室温直至液体被吸收, 倒置平板, 37°C 培养 12-16 小时。

## 注意事项

1. 感受态细胞需要在冰中缓慢融化，插入冰中 10 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. 混入质粒或连接产物时应轻柔操作，避免用移液枪吹吸。
3. 转化高浓度的质粒时可相应减少最终用于涂板的菌量。
4. 感受态细胞应保存在-80℃，请避免反复冻融，以免降低感受态细胞的转化效率。
5. 诱导时，IPTG 浓度可选 ( 0.1-2mM 均可 )。
6. 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。
7. Rosetta-gami(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  $\mu\text{g}/\text{ml}$  氯霉素，以防质粒丢失。
8. 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。
9. 由于此感受态细胞转化效率较低；为了更好的实验效果，建议至少转入 100ng 以上质粒，取 1/3 以上复苏后菌液涂板；否则有可能转化失败。