



AD494(DE3) Chemically Competent Cell 产品说明书

产品规格 (CAT#: YC236)

AD494(DE3) :	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

AD494 菌株含有 thioredoxin reductase (TrxB)基因突变, 有利于细菌胞内的二硫键形成, 能够帮助蛋白形成正确的三维折叠, 形成有功能活力的蛋白。AD494 菌株来源于 K12 菌, 有助于蛋白的形成正确的三维结构。AD494 菌株中的 thioredoxin reductase (TrxB)突变具有卡那霉素抗性, 因此该宿主菌只能用于氨苄或者其他非卡那霉素抗性的质粒, 进行基因蛋白表达。DE3 是溶源性的 λDE3, 所以带有 T7 RNA 聚合酶的染色体拷贝。该菌株适用于 pET 系列载体, 及其他 T7 启动子系列载体。能够利用 IPTG 直接进行蛋白的诱导表达, AD494 感受态细胞由特殊工艺制作, pUC19 质粒检测转化效率达 10^6 cfu/μg DNA。

基因型 : Δ (ara-leu)7967, Δ lacX74, Δ phoAPvuII, phoR, Δ malF3,F' [lac+(lacIq)pro] trxB::Kan(DE3)

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°C, 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. AD494(DE3)感受态具有 Kan 抗性, 不能用 Kan 质粒。

8. 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。