



Origami (DE3) Chemically Competent Cell 产品说明书

产品规格 (CAT#: YC243)

Origami (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

Origami 系列菌株是由 K-12 菌株衍生而来, 在 thioredoxin reductase (trxB)和 glutathione reductase (gor)基因上同时含有突变, 这使得该菌株能够更加高效的在细胞质内生成二硫键, 有助于含二硫键蛋白的活性蛋白形成。研究表明使用 Origami 系列的感受态细胞表达获得的活性二硫键蛋白比其他同类感受态细胞要多 10 倍左右。Origami 系列感受态细胞能够用于氨苄抗性质粒的蛋白表达, 尤其是和 pET32a 载体能够完美搭配使用。pET32a 载体含有 thioredoxin (TRX)融合标签, 能够高效提升胞质内蛋白二硫键的形成。TrxB 和 Gor 基因突变使得质粒能够分别具有卡那和四环素抗性, 所以本菌株无法用于卡那和四环素抗性质粒的蛋白表达。为了减少细胞内多种分子间的二硫键的形成, 含有 TrxB 和 Gor 基因突变的宿主菌被建议用于含二硫键正确折叠 蛋白的高效表达。DE3 是溶源性的 λDE3, 所以在 lacUV5 启动子下携带有 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。Origami (DE3) 为亮氨酸缺陷型菌株。Origami (DE3) 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)7697 ΔlacX74 ΔphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsLF'[lac+ lacIq pro] (DE3)gor522::Tn10 trxB (KanR, StrR, TetR)

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°C180rpm 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. 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。

8. Origami (DE3) 具有卡那和四环素抗性，不能用与卡那和四环素抗性质粒。