



# Rosetta 2(DE3)pLysS 感受态细胞

## Rosetta 2(DE3)pLysS Chemically Competent Cell

Cat.NO. ZC1253

目录编号	产品名称	包装单位
□ ZC1253	Rosetta 2(DE3)pLysS 感受态细胞	10×100μl

备注: 以上包装均含有 Compcell Control Plasmid pUC19(0.1ng/μl) 5μl (质量控制用)。

储存: -70°C 保存六个月。

### 产品介绍:

本公司生产的 Rosetta 2(DE3)pLysS 感受态细胞是采用特殊工艺处理得到的感受态细胞, 可用于 DNA 的化学转化。使用 pUC19 质粒检测, 转化效率高达  $10^7$  cfu/μg DNA 以上。

基因型为: F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm(DE3)pLysSRARE2(Cam<sup>R</sup>)

### 产品特点:

Rosetta2(DE3)pLysS 菌株携带pLysSRARE2质粒, 具有氯霉素抗性。pLysSRARE2含有表达T7溶菌酶的基因, T7溶菌酶可以作用于大肠杆菌细胞壁上的肽聚糖溶解大肠杆菌, 还可与T7 RNA聚合酶结合抑制其转录活性, 进而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;pLysSRARE2同时补充大肠杆菌缺乏的7种稀有密码子(AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA和CGG)对应的tRNA, 提高外源基因, 尤其是真核基因在原核系统中的表达水平, 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), 该区整合于大肠杆菌的染色体上, 可同时表达T7 RNA聚合酶和大肠杆菌RNA聚合酶, 用于pET系列, pGEX, pMAL等质粒的蛋白表达

### 操作步骤:

以下操作均按无菌条件的标准进行:

- **转化:**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 30 分钟。  
注意:所使用 DNA 体积不要超过感受态细胞悬液体积的 1/10, 100μl 感受态细胞能够被 1ng 超螺旋质粒 DNA 所饱和。
- **热激:**将离心管置于 42°C 水浴中放置 60-90 秒, 然后快速将管转移到冰浴中, 使细胞冷却 2-3 分钟, 该过程不要摇动离心管。
- **复苏:**向每个离心管中加入 500μl 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。
- **涂板:**根据实验要求 (质粒, 重组连接产物转化), 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。

### 提示：

- 刚刚化冻的细胞，转化效率最高。化冻后感受态细胞冰浴条件下，半小时内活性无明显变化，因此，同时转化多支感受态细胞时尽量半小时内加完目的 DNA。
- 感受态细胞应保存在  $-70^{\circ}\text{C}$ ，请避免反复冻融，以免降低感受态细胞的转化效率。
- 进行转化操作时，请在无菌条件下，根据相应温度要求进行实验。
- 避免用移液枪吹吸，整个过程要轻柔，尽量低温操作。
- 为防止转化实验不成功，可以保留部分连接反应液，以重新转化，将损失降到最低。
- 转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。
- 诱导时，IPTG 浓度可选 (0.1-2 mM 均可)。
- 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。
- Rosetta2(DE3)pLysS 菌株携带 pLysSRARE2 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  $34\mu\text{g/ml}$  氯霉素,以防质粒丢失。

### Sample Induction Protocol (for reference only)

1. Inoculate a single colony from a freshly streaked plate into 3ml of LB medium containing the appropriate antibiotic for the plasmid and host strain.
2. Incubate with shaking at 200rpm at  $37^{\circ}\text{C}$  overnight.
3. Inoculate 50ml of LB medium containing the appropriate antibiotic with 0.5ml of the overnight culture prepared in step 2(use the 500ml triangular flask as the container would be better).
4. Incubate with shaking at 150rpm at  $37^{\circ}\text{C}$  until the  $\text{OD}_{600}$  reaches 0.5-0.8. (0.6 recommended; about 2.5h).
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  $-20^{\circ}\text{C}$ . These will serve as the non-induced control samples.
6. Add IPTG to a final concentration of 1mM. Optimal time for induction of the target protein may vary from 2-16hours, depending on the protein.
7. Incubate with shaking at 120rpm at  $37^{\circ}\text{C}$  for 2-4hours. 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 2-16hours.
8. Place the culture on ice for 10minutes. Harvest cells by centrifugation at  $5,000\times g$  for 10minutes at  $4^{\circ}\text{C}$ .
9. Remove the supernatant and store the cell pellet at  $-20^{\circ}\text{C}$  (storage at lower temperatures is also acceptable).

### IPTG 配制：

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

### 氯霉素配制：

Chloramphenicol  $34\text{mg/ml}$  in ethanol. Store at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Use at  $34\mu\text{g/ml}$ .