



W3110(DE3) 感受态细胞

W3110(DE3) Chemically Competent Cell

Cat.NO. ZC1255

目录编号	产品名称	包装单位
■ ZC1255-1	W3110(DE3) 感受态细胞	100μl × 10

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 W3110(DE3) 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-λ- rph-1 INV(rrnD, rrnE)(DE3)(Cam^R)

产品特点:

W3110(DE3)是K-12的衍生菌株, 是一种经过较少改造, 比较接近于“WT-野生型”的大肠杆菌工程菌株, 基因组与MG1655菌株高度相似(与MG1655基因组相比, 有8个位点的基因突变)。W3110(DE3)菌株在液体培养时可耐受更高的菌体浓度, 同时蛋白产量明显高于其他原核表达菌株, 可作为蛋白表达的宿主菌株使用, 提高菌体和蛋白产量。W3110(DE3)菌株染色体整合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, W3110(DE3)菌株具有氯霉素抗性, 不含核酸酶endA1突变, 体内核酸酶含量较高, 提取质粒时务必使用质粒提取试剂盒中去蛋白液尽量去除核酸酶, 以防提取的质粒被降解。

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。
- **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°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。
- 具有氯霉素抗性，不能用于具有氯霉素抗性质粒的表达。

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°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°C until the 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°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°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°C .
9. Remove the supernatant and store the cell pellet at -20°C (storage at lower temperatures is also acceptable).

IPTG 配制：

Prepare a 1M solution of IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactoside; Isopropyl- β -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 34mg/ml in ethanol. Store at -20°C . Use at $34\mu\text{g}/\text{ml}$.