

BL21(DE3) 感受态细胞

产品信息

产品组成	ABK0015M
BL21(DE3) Competent cells	100 μ L x 20
pUC19 (0.1ng/ μ l)	5 μ L

产品存储

-70°C存储，避免反复冻融。

产品简介

BL21(DE3)感受态细胞是采用大肠杆菌BL21(DE3)菌株经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，转化效率可达 10^7 cfu/ μ g，-70°C保存几个月转化效率不发生改变。每支感受态可以酌情分装使用，降低了实验的成本。质量稳定，使用方便，质优价廉。

基因型： *F-ompT hsdS_B(r_B-m_B-)gal_ldc_m(DE3)*

产品特点

该感受态细胞用于以T7 RNA聚合酶为表达系统的高效外源基因的蛋白表达宿主。T7噬菌体RNA聚合酶基因的表达受控于 λ 噬菌体DE3区的lacUV5启动子，该区域整合于BL21的染色体上。该菌适合于非毒性蛋白的表达。

实验步骤（以下操作均在无菌条件下进行）

1.取感受态细胞置于冰浴中，如需分装可将刚融化细胞悬液分装到无菌预冷的离心管中，置于冰浴中。(一次转化感受态细胞的建议用量为50-100 μ L，可以根据实际情况分装使用。应注意所用DNA体积不要超过感受态细胞悬液体积的十分之一。)以下实验以100 μ L感受态细胞为例。

2.向感受态细胞悬液中加入目的DNA，轻轻旋转离心管以混匀内容物，在冰浴中静置30分钟。

3.将离心管置于42°C水浴中放置60秒钟，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。(此步骤也可将离心管置于室温进行，时间不需十分准确，夏季或室温较高时，可放置5-8分钟左右;如果室温较低，可延长时间至8-15分钟左右。条件允许建议使用42°C热激方法。)

4.向每个离心管中加入500 μ L无菌的SOC或LB培养基(不含抗生素)，混匀后置于37°C，150 rpm，床振荡培养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。

5.无菌条件下，取适量菌液加到含相应抗生素的LB固体培养基平板上，用无菌的细菌涂布器或玻璃珠将细胞均匀涂开。等平板中的液体完全吸收后，倒置平板，37°C培养12-16小时。(涂布用量可根据具体实验来调整。转化质粒在10ng左右，90mm平皿涂布100 μ L，55mm平皿涂布50 μ L;连接产物的转化菌液建议离心后倒掉大部分上清，余200 μ L，取100 μ L用于涂布。)

6.保留剩余的菌液于4℃冰箱中，视平板上菌落生长情况决定去留。

相关试剂及培养基的制备方法:

1. LB 液体培养基:称取10g Tryptone, 5g Yeast Extract 和10g NaCl置于1L烧杯中。加入约800mL的去离子水,完全溶解后用2mol/L的NaOH溶液调节pH值至7.0。加去离子水定容至1L。分装后,121℃高压灭菌20分钟。

2. SOB和SOC培养基:称取20g Tryptone, 5g Yeast Extract, 0.5g NaCl 置于1L烧杯中加入约 800mL的去离子水,完全溶解后再补加10mL 250Mm KCl溶液,滴加 5M NaOH(约0.2mL)调pH至7.0。加入去离子水将培养基定容至1L。121° C灭菌20分钟。使用时加入5mL灭菌的2M MgCl₂溶液(此种培养基称为SOB)。再补加经0.22μm过滤除菌的1M葡萄糖溶液2mL(此种培养基为SOC)。

3.转化复苏细菌用的液体LB培养基或SOC培养基:可以一次高压50mL液体培养基,无菌状态按1mL每管分装于高压灭菌的1.5mL离心管中,装于自封袋中,冻存于-20℃中,每次用一支。可以极大地避免培养基污染和减少劳动量。

4.LB固体选择培养基:100mL LB液体培养基中加入1.5g琼脂粉,摇匀后,121℃高压灭菌20分钟。冷却至50℃左右时加入相应浓度的抗生素(如 AMP浓度通常为100ug/mL),混匀后倒在细菌用的无菌培养皿中,等琼脂凝固后即可使用。

5.IPTG:称量1.9g IPTG(MW=238.31)充分溶解于40mL灭菌水,浓度为200mmol/L。用无菌0.22μm过滤膜过滤除菌。小份分装后,-20℃保存。

6.X-gal:用DMF(二甲基甲酰胺)配制成20mg/mL,小份分装(1mL/份)后,-20℃避光保存。

注意事项

1、感受态细胞应保存在-70℃,不可多次冻融和放置时间过长,以避免降低感受态细胞的转化效率。

2、进行转化操作时,应根据相应温度及无菌条件的要求进行。

3、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。