ArcticExpress (DE3) Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格（CAT#：EC2020）

ArcticExpress (DE3) Competent Cell	100μl /支
pUC19 (control vector, 10pg/μl)	10μl
保存条件（保质期）：	-80˚C（6 个月）

● 基因型

E. coli B F– *ompT hsdS*(rB– mB–) *dcm*+ Tet^R *gal* λ(DE3) *endA* Hte [*cpn10cpn60* Gent^R]

● 产品说明

ArcticExpress (DE3)来源于 E. coli B，为 Lon 和 OmpT 蛋白酶缺陷型菌株，可促进表达蛋白的稳定。ArcticExpress (DE3)菌株染色体 DNA 中整合了 λ 噬菌体 DE3 区，使得 ArcticExpress (DE3)菌株可同时表达 T7 RNA 聚合酶和大肠杆菌 RNA 聚合酶，广泛用于 pET 系列，pGEX，pMAL 等质粒的蛋白表达。ArcticExpress (DE3)菌株具有四环素，庆大霉素抗性，*end*A1 突变有利于质粒 DNA 的稳定。[cpn10cpn60 Gent^R]的存在使 ArcticExpress (DE3)可以表达适应低温的伴侣蛋白 Cpn10 和 Cpn60（来自嗜冷菌—Oleispira antarctica）。Cpn10 和 Cpn60 伴侣蛋白在 4-12˚C表现出较高活性，在 ArcticExpress(DE3)细胞中表达时，可降低重组蛋白包涵体的形成，增加可溶重组蛋白的表达量及生物活性，比传统的原核表达伴侣蛋白 GroEL、GroES 等具有更加优异的促融性能。唯地生物生产的 ArcticExpress (DE3)感受态细胞经特殊工艺制作，pUC19 质粒检测转化效率达 10^8cfu/μg DNA。

● 操作方法

1. ArcticExpress (DE3)感受态细胞从-80˚C拿出，迅速插入冰中，5 分钟后待菌块融化，加入目的质粒，并用手拨打 EP 管底混匀，冰中静置 25 分钟。
2. 42˚C水浴热激 45 秒，迅速放回冰上并静置 2 分钟，晃动会降低转化效率。
3. 向离心管中加入 700 μl 不含抗生素的无菌培养基（LB），混匀后 37˚C，200 rpm 复苏 60 分钟。
4. 5000 rpm 离心一分钟收菌，留取 100 μl 左右上清轻轻吹打重悬菌块并涂布到含相应抗生素的 LB 培养基上（（平板中务必同时含有 40ug/ml 的庆大霉素和转化质粒本身的筛选抗生素；若质粒浓度较高，也可稀释后涂板，务必保证能在平板上挑到单克隆菌落）。
5. 将平板倒置放于 37˚C培养箱过夜培养。

● 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 200 rpm at 37˚C overnight.
3. Inoculate 50 ml of LB medium containing the appropriate antibiotic with 0.5 ml of the overnight culture prepared in step 2(use the 500 ml triangular flask as the container would be better).
4. Incubate with shaking at 150 rpm 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 1 mM. Optimal time for induction of the target protein may vary from 2-16 hours, depending on the protein.
7. Incubate with shaking at 120 rpm at 37˚C for 2-4 hours. 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 2-16 hours.
8. Place the culture on ice for 10 minutes. Harvest cells by centrifugation at 5,000×g for 10 minutes 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 1 M solution of IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactoside; Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) by dissolving 2.38 g of IPTG in dd water and adjust the final volume to 10 ml. Filter sterilize before use.

● 注意事项

1. 感受态细胞最好在冰中缓慢融化，插入冰中 8 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. 转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。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 40ug/ml 的庆大霉素，以防质粒丢失。
3. 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。
4. ArcticExpress (DE3)感受态细胞具有四环素、庆大霉素抗性，不可用于具有四环素、庆大霉素抗性质粒的转化。