



BL21(DE3) Chemically Competent Cell 使用说明书

产品编号: CC553 (原货号 CC510)

产品组成:

BL21(DE3) Competent Cell	100 μL/支
pUC19 (control vector, 10 pg/μl)	10 μL
保存条件 (保质期):	-80°C (6 个月)

基因型:

F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm(DE3)

产品说明:

BL21(DE3)菌株用于高效表达克隆于含有噬菌体 T7 启动子的表达载体(如 pET 系列)的基因。λ 噬菌体 DE3 区含有 T7 噬菌体 RNA 聚合酶, 该区整合于 BL21 的染色体上, 所以称为 BL21(DE3)。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。BL21(DE3) 是一种大肠杆菌 B 菌株, 不含 lon 蛋白酶。它还缺乏外膜蛋白酶 OmpT。缺乏这两种关键蛋白酶可减少细胞中表达的异源蛋白的降解。pUC19 质粒 (2686bp, Amp^R) 检测转化效率>10⁷ cfu/μg DNA。

使用方法:

1. BL21(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 DNA (质粒或连接产物) 并用手拨打 EP 管底轻轻混匀(避免用枪吸打), 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 (2YT 或 LB), 混匀后 37°C, 200 rpm 复苏 60 分钟。
4. 5000 rpm 离心 1 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 2YT 或 LB 培养基上。
5. 将平板倒置放于 37°C培养箱过夜培养。



蛋白小量诱导表达 Protocol:

1. 小摇接菌：在透气试管或透气离心管中准备 1-3 mL 含相应抗生素的液体 LB（或 2YT、TB、SB 等营养丰富培养基），接入一个含有目的质粒的新鲜单菌落。以质粒 pet32a 为例：在 TB 营养液中过夜培养的菌体浓度约为 LB 的 3-5 倍，SOB 的 2-3 倍。

2. 37°C，200 rpm 过夜摇菌约 10-15 h。

3. 大摇接菌：将第一步的小摇菌液按 1-2%比例接菌到 50 mL 含相应抗生素的 LB（或 2YT、TB、SB 等营养丰富培养基），为增加溶氧，最好使用 500 mL 三角瓶（加入营养液的体积一般为三角瓶标定体积的 1/10，最高不超过 1/5）。

4. 37°C，150 rpm 摇菌到 OD600 值为 0.5-0.8（一般需要 2-4h）。

5. 空白对照取样(可选步骤)：在加入诱导剂 IPTG 前可取样 1 mL 菌液到 1.5 mL 离心管中，12000 rpm 离心 10 分钟，弃上清，沉淀放-20°C保存待用。

6. 第四步的三角瓶中加入 IPTG 至终浓度为 1 mM（IPTG 浓度可自由调整，1 M IPTG 溶液货号：SL3861），继续 37°C，120 rpm 摇菌 2-4h。

7. 不同时间点取样(可选步骤)：最佳摇菌时间与所表达蛋白有关，表达蛋白不同最佳摇菌时间不同，为找到最佳诱导时间可在不同诱导时间点取样（例：在诱导第 2h，4h，6h，8h，14h 取样，离心后放-20°C 保存）。

8. 离心收菌：三角瓶从摇床拿出，埋入冰中 10 分钟，4°C，5000g，10 分钟离心，弃上清，沉淀保存在-20°C。

9. 待所有样品准备妥当，可以做 SDS-PAGE 分析蛋白表达。

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。混入目的 DNA 时应轻柔操作。

2. 转化高浓度的质粒或高效率的连接产物可相应减少最终用于涂板的菌量。

3. 诱导时，IPTG 浓度可选（0.1-2 mM 均可）。

4. 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。

5. 不适合维持表达质粒。使用不携带 T10 RNA 聚合酶基因的 DH5B 或 DH7α 感受态细胞进行质粒 DNA 增殖。