# W3110(DE3) Chemically Competent Cell 产品说明书

## 产品规格

| | |
|---|---|
| W3110(DE3) Competent Cell | 100μl /支 |
| 保存条件（保质期）： | -80℃（6个月） |

## 基因型

F- λ- *rph-1* INV(*rrn*D, *rrn*E)(DE3)($Cam_R$)

## 产品说明

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。W3110(DE3)感受态细胞由特殊工艺制作，pUC19 质粒（2686bp，$Amp_R$）检测转化效率>$1\times10^7$ cfu/μg DNA。

## 操作方法

1. W3110(DE3)感受态细胞从-80℃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 管底轻轻混匀(避免用枪吸打)，冰中静置 25 分钟。
2. 42℃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℃， 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 2YT 或 LB 培养基上。
5. 将平板倒置放于 37℃培养箱过夜培养。

## 蛋白小量诱导表达 Protocol (for reference only)

1. 小摇接菌：在透气试管或透气离心管中准备 1-3ml 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。
2. 37℃， 200 rpm 过夜摇菌约 10-15h。
3. 大摇接菌：将第一步的小摇菌液按 1-2%比例接菌到50ml 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500ml 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℃， 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 1ml 菌液到 1.5ml 离心管中，12000rpm 离心 10 分钟，弃上清，沉淀放-20℃保存待用。
6. 第四步的三角瓶中加入 IPTG 至终浓度为 1mM（IPTG 浓度可自由调整），继续 37℃， 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℃保存）。
8. 离心收菌：三角瓶从摇床拿出，埋入冰中 10 分钟， 4℃， 5000g，10 分钟离心，弃上清，沉淀保存在-20℃。
9. 待所有样品准备妥当，可以做 SDS-PAGE 分析蛋白表达。

## 1 M IPTG 溶液配制

2.38 g IPTG 加入无菌的双蒸水 10 mL ，完全溶解后用 0.22um 的滤膜过滤除菌。

## 氯霉素配制:

氯霉素(Chloramphenicol) 100mg/ml 溶于乙醇，完全溶解后用 0.22um 的滤膜过滤除菌；工作浓度：34 μg/ml。

## 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。
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. 具有氯霉素抗性，不能用于具有氯霉素抗性质粒的表达。