

BL21(DE3)电转化感受态使用说明

◇ 产品简介

本品为大肠杆菌 BL21(DE3) (基因型: F- *ompT hsdSB*(r_B⁻ m_B⁻) *gal dcm*(DE3)) 制作的电击感受态细胞, 只能用于电击转化, 不能用于热激转化。BL21(DE3)为 Lon 蛋白酶和 OmpT 外膜蛋白酶缺陷菌株。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)。BL21(DE3)菌株可同时表达 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, 可用于各种多肽, 蛋白表达文库的构建。BL21(DE3)电击感受态细胞经特殊工艺制作, pUC19 质粒 (2686bp, Amp^R) 检测转化效率 > 1 × 10¹⁰ cfu/μg DNA。

◇ 产品规格

品名	货号	规格
BL21(DE3)电转化感受态	EL021H-S	10×50 μL
	EL021H-M	50×50 μL

-80°C (12 个月)

◇ 转化方法

1. 取适量 LB 放 37 度预热 1-2 小时 (每管感受态准备 10ml LB)。
2. 0.1 cm 电击杯和杯盖从储存液中拿出倒置于干净的吸水纸上 5 分钟沥干水分, 正置 5 分钟, 待乙醇挥发干净立即插入冰中, 压实冰面, 电击杯顶离冰面 0.5 cm 以方便盖上杯盖, 冰中静置 5 分钟充分降温。
3. 取 -80°C 保存的电击感受态细胞插入冰中 5 分钟, 待其融化, 加入目的 DNA (质粒或连接产物) 并用手拨打 EP 管底轻轻混匀, 避免产生气泡, 立即插入冰中。
4. 用 200 ul 枪头 (用刀切除 0.5cm 枪尖) 将感受态-DNA 混合物快速移到电击杯中 (避免产生气泡), 轻轻晃动使液面保持水平状态, 盖上杯盖, 插入冰中。
5. 启动电转仪, 根据仪器要求设置参数, 将电击杯从冰中拿出, 用吸水纸擦拭表面, 吸干表面水渍, 放入电转槽中, 电击完成后拿出电转杯放室温, 打开杯盖, 15 秒内加入 100ul 预热的 LB (此步骤可在电转仪旁操作, 无需在超净台操作), 用 1ml 枪吹吸电击杯底部 2-3 次, 混匀后转移到 50 ml 离心管, 向离心管中补加 LB 培养基至 10 ml。37°C, 220 rpm 复苏 60 分钟。
6. 5000rpm 离心一分钟收菌, 留取 100-200ul 菌液重悬后涂布到含相应抗生素的平板上。将平板倒置放于 37°C 培养箱过夜培养 12-16 小时。

注意事项

1. 加入 DNA 时体积不应大于感受态体积的 1/10。
2. 电击感受态细胞加入电击杯应避免产生气泡, 气泡会增加弧光放电风险。
3. 当 DNA 不纯或存在盐, 乙醇, 蛋白及缓冲液等污染时, 转化效率急剧下降。
4. 电击杯里的离子可增加溶液的电导, 增大在含有细胞和 DNA 的溶液中产生电流和弧光放电的风险。
5. 若转化大质粒或想获得较高转化效率, 推荐使用高纯质粒提取试剂盒提取质粒。质粒增大一倍, 转化效率下降一个数量级。

6.对于连接产物，最好用膜纯化或乙醇沉淀法纯化 DNA 后用适量 ddH₂O 或 TE 缓冲液(10 mM Tris HCl, pH7.5;1 mM EDTA)重悬产物，保证 DNA 浓度不超过 100 ng/ul。过高浓度连接产物或过大体积连接产物会降低转化效率，增加弧光放电的风险。

7. 混入质粒时应轻柔操作，吸取感受态细胞时避免用力过猛，以免剪切力过大损伤细胞膜，降低转化效率。转化高浓度的质粒或连接产物可相应减少最终用于涂板的菌量。

8. 电击感受态细胞最好保存在-80℃以下，高于-80℃超期储存会导致转化效率会下降。