

# 大肠杆菌蛋白表达感受态细胞的制备

## 感受态细胞的概念

感受态，是指宿主细胞最容易接受外源基因并实现将其转化的一种生理状态，它是由受体菌的遗传性状所决定的，同时也受菌龄以及外界环境因子的影响，比如  $\text{Ca}^{2+}$  就可以大大促进转化的作用。细胞的感受态一般出现在对数生长期，新鲜幼嫩的细胞是制备感受态细胞和进行成功转化的关键。

## 感受态细胞制备的原理

制备感受态细胞最常用的方法是用预冷的  $\text{CaCl}_2$  处理对数生长期的细菌，即用低渗  $\text{CaCl}_2$  溶液在低温 ( $0^\circ\text{C}$ ) 时处理快速生长 (进入对数生长期) 的细菌，从而获得感受态细胞。此时细胞膨胀成球形，外源 DNA 分子在低温条件下易形成抗 DNA 酶的羟基 - 钙磷酸复合物粘附在细胞表面，通过热激处理促进细胞对外源 DNA 分子的吸收。转化效率非常高。此方法的关键在于选用的细胞必须处于对数生长期，实验操作必须在低温无菌环境下进行。

## 大肠杆菌感受态细胞的制备实验

### 1、实验仪器及试剂

仪器：超净工作台，摇床，高压灭菌锅，培养箱，制冰机，超低温冰箱，离心机，接种环，试管，摇瓶 (2L)，平板，移液枪，枪头，离心管 (500mL)，EP 管 (1.5mL)，蓝盖瓶，泡沫箱

试剂： $\text{CaCl}_2$  溶液：PIPES 1.51g， $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  4.41g，甘油 75ml，pH=7.0，定容至 500ml。

LB 培养基 (固体、液体)：Tryptone 1.00g，Yeast 0.50g，NaCl 1.00g，定容至 100ml。(固体培养基加入 1.5% 的琼脂)

抗性：卡那霉素，氨卞青霉素，氯霉素，四环素。

- 材料：感受态菌株

### 2、实验方法及操作步骤

- 取  $-80^\circ\text{C}$  冻存的感受态菌株，用接种环划线分离接种于固体平板上 (平板抗性根据感受态选择)，做好标记，倒置于  $37^\circ\text{C}$  培养箱培养过夜。

- 第二天，从平板上挑取单个菌落，接种至含有 4ml LB 培养液（抗性根据感受态选择）的试管中，37°C，195rpm，震荡培养过夜。次日取菌液 4ml 接种至含有 400ml LB 培养基（抗性根据感受态选择）的 2L 摇瓶中，37°C，200rpm 震荡培养约 2-3 小时。
- 当菌落 OD<sub>600nm</sub> 值达到 0.3 - 0.5 时 将摇瓶取出放置于冰上 10-15min。在无菌条件下把菌液倒入 500ml 的预冷的离心管中，离心 4°C,3000r，8min。
- 弃去上清，加入约 200ml 的预冷的 CaCl<sub>2</sub> 溶液，吹打混匀，悬浮菌体，放入冰浴 30min。
- 离心 4°C，3000r，8min，弃去上清，加入约 8ml 预冷的 CaCl<sub>2</sub> 溶液，重新悬浮菌体。
- 将用 CaCl<sub>2</sub> 溶液处理后的菌体分装于 1.5ml 的 EP 管中，每管 110ul，保存于-80°C的超低温冰箱中。

## 感受态细胞测试

随机取 1 支本次制备的感受态细胞，转化一个以前转化成功的质粒，从转化平板上的菌落数及表达鉴定的 SDS-PAGE 电泳图（看是否出现其他的杂带及蛋白表达情况）判断感受态的效价。如果效价好，这批感受可以用；否则，要重新制备。

## 注意事项

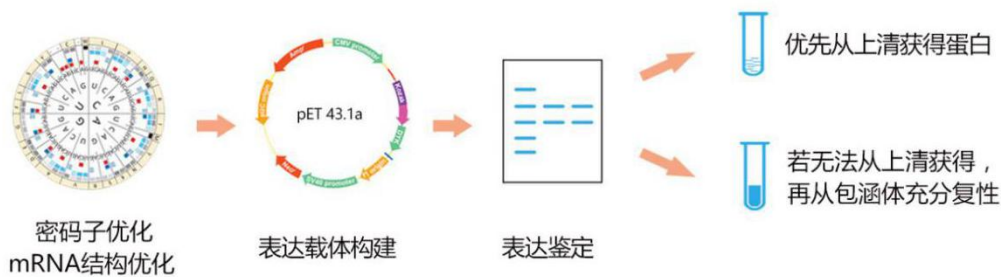
- 1、每次取感受态细胞时，注意查看库存，保证库存不低于 15 支，少于 15 支时要及时制备。
- 1、菌株生长在对数时进行 CaCl<sub>2</sub> 处理。
- 2、全程操作要【低温无菌】。
- 3、用 CaCl<sub>2</sub> 溶液悬浮菌体时要均匀，不要有块状。
- 4、常用感受态细胞的选择抗性：BL21 ( DE3 ) 无抗性；BL21 Codon plus ( DE3 ) 具有氯霉素抗性；OrigamiB ( DE3 ) 具有卡那霉素抗性，不能用于具有卡那霉素抗性质粒的表达；BL21( DE3 ) plysS 具有氯霉素抗性；Rosetta ( DE3 ) 具有氯霉素抗性；Shuffle 具有链霉素抗性或不用抗性。

## 南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

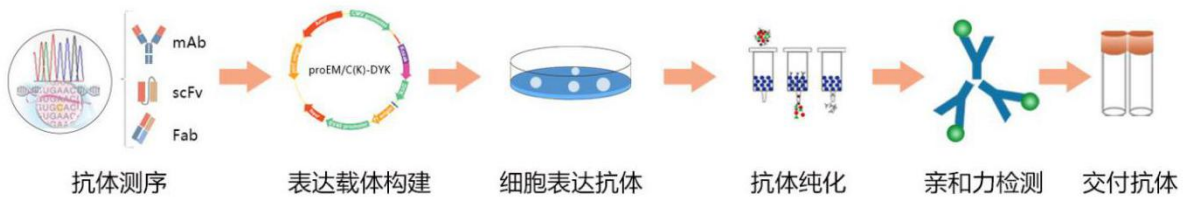
### 一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



### 二、蛋白表达（大肠杆菌表达）成功率>95%，不成功不收费，成功有保障



### 三、重组抗体表达 若想改造一个抗体，可以试试重组表达



### 四、稳定细胞系构建 研究级细胞系构建 & 高表达细胞株开发

