

Rosetta(DE3)(甘油菌)

产品编号: MB15012-1 规格: 200μL

产品内容:

产品组成	MB15012-1
Rosetta(DE3)(甘油菌)	200μL
说明书	1 份

产品简介:

Rosetta(DE3)甘油菌, 是收集生长在对数期的 Rosetta(DE3)菌, 加入含有甘油的细菌冻存液制备而成。可以直接划平板或小量、大量培养。本菌株适用于 T7 启动子(T7 promoter)调控目的基因表达的 pET 系列等原核表达质粒, 特别适合带有真核基因特异性的稀有密码子的真核基因在大肠杆菌中的 IPTG 诱导表达, 能有效提高真核基因的蛋白表达水平。

BL21 缺失细胞质中的 Lon 蛋白酶(Lon protease)和胞外膜上的 OmpT 蛋白酶(OmpT protease), 能有效避免重组表达蛋白的降解, 所以被广泛用作外源蛋白的表达菌株。

BL21(DE3)是 BL21 被λ噬菌体 DE3 溶原化(lysogenization)的衍生菌株, 在 lacUV5 启动子控制下可表达噬菌体 T7 RNA 聚合酶(相关基因序列已经整合到细菌染色体中)。IPTG 可以诱导 BL21(DE3)菌株中 T7 RNA 聚合酶的高表达, 因此 BL21(DE3)菌株适合受 T7 启动子(T7 promoter)调控的目的基因通过 IPTG 诱导表达。常见的 pET 系列原核表达载体中目的基因的表达都是受 T7 启动子调控的, 因此都适合用 BL21(DE3)作为宿主菌。

Rosetta 是大肠杆菌 BL21(DE3)的衍生菌株, 含有一个氯霉素抗性基因的质粒, 该质粒可转录产生识别 6 种大肠杆菌的稀有密码子(AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA)的 tRNA(这些 tRNA 是由它们天然的 promoter 驱动转录的), 由此 Rosetta 能够大大提高带有真核基因特异的稀有密码子的真核基因在大肠杆菌中的表达水平。

Rosetta(DE3)是 Rosetta 被λ噬菌体 DE3 溶原化的菌株, 在 lacUV5 启动子控制下可表达噬菌体 T7 RNA 聚合酶, 因此其适合通过 IPTG 诱导的、克隆到 pET 系列载体中的、带有对于大肠杆菌而言是稀有密码子的真核基因的表达。

Rosetta(DE3)基因型: F- *ompT hsdS_B* (r_B- m_B-) *gal dcm* (DE3) pRARE (Cam^R)。

本菌株可以使用常规的 LB 培养基或 SOC 培养基进行培养。

操作方法:

(一) 实验前准备:

1. 将 Rosetta(DE3)甘油菌保种管置于冰盒中, 全程需在超净工作台内实施无菌操作。
2. 准备含 20μg/ml 氯霉素的 LB 固体培养基平板或 LB 液体培养基, 使用前室温平衡 30 分钟。

(二) 菌种培养:

a. 划平板接种:

1. 接种环灭菌: 将接种环置于酒精灯外焰灼烧灭菌, 使接种环处于无菌状态, 冷却至室温后使用。
2. 初代划线: 接种环蘸取少量已解冻的菌液, 使接种环与 LB 固体培养基呈 30-40° 夹角, 在含 20μg/ml 氯霉素的 LB 平板上连续作 S 形或 Z 形轻轻划动, 进行不重叠来回划线, 首区覆盖面积约占整个平板的 1/5-1/6。
3. 继代划线: 每完成一个划线区后重新灼烧灭菌接种环, 冷却至室温, 与前次轨迹呈 90° 或 120° 夹角, 依次进行第二至第四象区的交替划线。
4. 培养条件: 倒置平板于 37°C 恒温培养箱, 培养 12-16 小时。

b. 直接培养:

1. 使用 70%乙醇浸润镊子尖端, 经酒精灯外焰灼烧灭菌, 待冷却后夹取无菌塑料枪头或牙签, 蘸取少量已解冻菌液, 将带菌接种物转移至含 3mL LB 液体培养基(含 20μg/ml 氯霉素)试管内或者 100mL 及以上体积 LB 液体培养基(含 20μg/ml 氯霉素)的细菌培养瓶中。



2. 置于恒温振荡培养箱中 37℃, 200rpm 振荡培养 12-16 小时。

(三) 感受态细菌的制备

可以使用美仑生物的超级感受态细菌制备试剂盒(货号: MA0661)或其他方法进行感受态细胞的制备。

保存条件: -20℃ 保存, 3 个月有效。-80℃ 可以长期保存。

运输条件: 湿冰运输。

注意事项:

- 使用本甘油菌时可以不必要完全融解, 在甘油菌表面蘸取少量涂板或进行液体培养即可。也可以完全融解后使用, 但随着冻融次数的增加细菌的活力会逐渐下降。
- 为保证菌种纯正, 避免其它细菌污染, 尽量先划平板然后再挑单克隆菌落进行后续操作。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

S250401

