上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co.， Ltd
电话：021-61312973　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：shyysw@sina.com

SHuffle T7 E. coli 感受态细胞

货号：S35195

保存温度：-80℃保存，有效期 3 个月。

基因型：

F′lac, pro, lacIq / Δ (ara-leu)7697 araD13fhuA2 lacZ::T7 gene1 Δ (phoA)Pvull phoR ahpC* galE(or U) galK λ att::pNEB3-r1-cDsbC (SpecR, laclq) Δ trxBrpsL150(StrR) Δgor Δ (malF)3

简要说明：

SHuffle T7 E. coli 菌株是 K12 的衍生菌株。该菌株的染色体中整合了一个拷贝的二硫键异构酶 DsbC 基因，可以促进含有二硫键蛋白的正确折叠；此外 DsbC 还是一个分子伴侣，可以帮助不含二硫键蛋白正确折叠，形成正确构象，同时该菌株可降低目的基因的本底表达，适合于毒性基因的原核表达。

SHuffle T7 E. coli 菌株染色体中整合了一个拷贝的 T7 RNA 聚合酶基因，可以表达噬菌体 T7 RNA 聚合酶，适合于 T7 启动子诱 导的蛋白表达；该菌株还可以表达大肠杆菌 RNA 聚合酶，所以可用于 pET 系列，pGEX，pMAL 等质粒的蛋白表达。SHuffle T7 E.coli 菌株具有抗 T1 噬菌体感染的特点，具有链霉素，壮观霉素抗性。

SHuffle T7 E. coli 感受态细胞由特殊工艺制作，pUC19 质粒（2686bp，AmpR）检测转化效率>107 cfu/μg DNA。

操作说明：

1. SHuffle T7 E. coli 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，迅速放回冰中并静置 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 LB 无菌培养液，37℃，200 rpm 复苏 60 分钟。

4. 5000 rpm 离心一分钟收菌，留取 50 μl 左右上清轻轻吹打重悬菌块并涂布到含相应抗生素的 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。

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（0.1-10 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. SHuffle T7 E. coli 菌株具有链霉素，壮观霉素抗性，不可用于具有链霉素，壮观霉素抗性质粒的转化。