Shuffle T7-B 感受态细胞

产品信息：

组成	BC209-01	BC209-02
Shuffle T7-B Competent cells	10×100μl	20×100μl
pUC19（0.1ng/μl）	5μl	5μl

储存条件：-70℃保存，避免反复冻融。

产品说明：

Shuffle T7-B 菌株为大肠杆菌 BL21 增强型菌株，为 Lon 和 OmpT 蛋白酶缺陷型，适用于 T7 启动子启动的蛋白表达。细胞内组成型表达的二硫键异构酶 DsbC 不仅有利于表达蛋白形成正确的二硫键，并具有分子伴侣的功能，帮助不含二硫键的蛋白正确折叠。T7 RNA 聚合酶基因整合在细菌染色体上的 lac 操纵子区域，基因组中无 λ 前噬菌体序列，具有抗 T1 噬菌体感染特点。Shuffle T7-B 感受态细胞经特殊工艺制作，pUC19 质粒检测转化效率大于 10^6 cfu/μg。

基因型：

fhuA2lacZ::T7gene1[lon]ompTahpCgalλatt::pNEB3-r1-cDsbC(Spec^{R}lacIq)ΔtrxBsulA11R(mcr-73::miniTn10-Tet^S) 2 [dcm] R(zgb-210::Tn10 --Tet^S) endA1 Δgor Δ(mcrC-mrr)114::IS10

菌株抗性：对氨苄青霉素，氯霉素，卡那霉素和四环素敏感，对链霉素和壮观霉素有抗性。

质粒转化步骤：

1. 将感受态细胞置于冰水浴中化冻。待细胞刚化冻后，加入质粒 DNA 到细胞中，用手指拨打管底，轻轻混匀；
2. 冰水浴中放置 30 分钟，不要晃动；
3. 42℃热击 60 秒钟，不要晃动；
4. 冰水浴中放置 2 分钟，不要晃动；
5. 加入 500μl 的室温的 SOC 或 LB 培养基；
6. 置于 30℃摇床中，150-200rpm，复苏培养 60 分钟；
7. 取 50-100μl 菌液涂布在含有抗性的 LB 平板上。待液体吸干后，倒置平板 30℃培养 12-24 小时。

（**平板划线分离法：**复苏培养结束后，12000rpm 离心 30 秒钟，弃掉上清，留 100μl 左右的液体，用 200μl 吸头轻轻吹打散菌块，取 10μl 重悬的菌液分多点滴在平板上，倾斜吸头，用吸头头部的侧面将滴在平板上的液体来回划线。这个方法可以获得更多更大的单克隆菌落）

（**质粒快速转化步骤：**将步骤 2 的时间缩短到 5 分钟，对于氨苄青霉素抗性的质粒，步骤 4 完成后，可直接涂布或划线于含抗生素的平板上。其它抗性的质粒仍需 40-60 分钟的复苏培养。）

蛋白表达步骤：

1. 挑取单菌落，接种到含 5ml 带抗生素的 LB 培养基中；
2. 30℃，200rpm 震荡培养细菌至对数生长期（OD_{600}=0.4-0.8）；
3. 加入 IPTG 到终浓度为 0.4mM，30℃诱导 4 小时或 16℃诱导过夜；
4. 诱导完成后，离心收集菌体，用合适的方法（如考马斯亮蓝染胶法，Western-Blot法或酶活性分析法）分析菌体裂解物的总蛋白、上清和沉淀组分，明确表达产物的表达状况（可溶性或不溶性表达）；
5. 重组蛋白大量表达时，可用 10ml 过夜培养物转接到 1L 培养基中，当培养到 OD_{600}=0.4-0.8 时，加入终浓度为 0.4mM 的 IPTG，30℃诱导 4 小时或 16℃诱导过夜（不同蛋白表达的最佳条件有所不同，需在实验中优化）。

BM190322