



BL21(DE3)T1 Δ pfkA Δ sthA 大肠杆菌化学感受态细胞

产品信息:

组成	BC229-01
BL21(DE3)T1 Δ pfkA Δ sthA Competent cells	10 $\times$ 100 μ l
pUC19 (0.1ng/ μ l)	5 μ l

储存条件: -70℃保存，避免反复冻融。

产品介绍:

BL21(DE3)T1 Δ pfkA Δ sthA 菌株是在大肠杆菌 BL21(DE3)T1 表达菌株基础上，通过基因工程手段完全敲除基因组上的 pfkA 基因（编码磷酸果糖激酶-1）和 sthA 基因（编码可溶性吡啶核苷酸转氢酶）而构建的稳定遗传的双基因缺陷型菌株。该菌株旨在重构胞内辅因子 NADPH 的代谢网络。其中，pfkA 的缺失迫使碳源代谢从糖酵解转向磷酸戊糖途径——细胞生成 NADPH 的主要途径；sthA 的缺失则切断了 NADPH 被再氧化为 NADP⁺ 的主要消耗途径。两者协同作用，提高胞内 NADPH/NADP⁺ 的比率，NADPH 产量显著提升，从而为需要 NADPH 作为辅因子的生物合成途径提供充足的还原力和能量支持。该菌株特别适用于依赖 NADPH 的合成生物学生产体系，例如萜类化合物（如法尼烯、青蒿酸、番茄红素）、聚酮化合物、部分氨基酸和醇类等或者需要 NADPH 参与的酶催化反应，在合成生物学产物生产中具有重要应用价值。

此外，该菌株具有抗 T1 噬菌体感染的特性，缺乏细胞质蛋白酶 Lon 和外膜蛋白酶 OmpT。该菌株具备 λ 噬菌体 DE3 基因区，可以表达 T7 RNA 聚合酶，适用于含有 T7 启动子的原核表达载体（如 pET 等）的高效表达。非 T7 启动子的表达载体（如 pGEX、pMal、pTrc 等载体）也可以在该菌株中表达。BL21(DE3)T1 Δ pfkA Δ sthA 感受态细胞由特殊工艺制成，pUC19 质粒检测转化效率大于 1 $\times$ 10⁶ cfu/ μ g DNA。

基因型: fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] Δ hsdS λ DE3 = λ sBamHIo Δ EcoRI-B int:: (lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δ nin5 Δ pfkA Δ sthA

菌株抗性: 氨苄青霉素、卡那霉素、壮观霉素、氯霉素、四环素、链霉素、庆大霉素敏感。

质粒转化步骤:

1. 取感受态细胞置于冰水浴中解冻。待其刚刚融化时，加入目的质粒 DNA 或 5–10 μ l 连接产物，用手指轻弹管，混匀。
2. 将混合物继续在冰水浴中静置 30 分钟，期间请勿晃动。
3. 迅速转移至 42℃ 水浴，热激 60 秒，过程中勿移动离心管。
4. 立即放回冰水浴，静置 2 分钟，勿晃动。
5. 加入 500–1000 μ l 无菌 SOC 或 LB 等复苏培养基。
6. 置于 37℃ 摇床中，以 150–200 rpm 振荡培养 60 分钟，进行复苏。
7. 取 50–100 μ l 菌液，涂布于含相应抗生素的 LB 平板上。待菌液被平板吸收后，倒置平板，于 37℃ 培养 12–16 小时。

附：平板划线分离法（可选）

1. 复苏培养结束后，12,000 rpm 离心 30 秒，弃去大部分上清，保留约 100 μ l。
2. 使用 200 μ l 吸头轻柔吹打，重悬菌体。
3. 取 10–50 μ l 菌液，在抗性平板的不同位置点若干液滴。
4. 倾斜吸头，以其侧面将液滴在平板表面来回交叉划线将液滴划开。
5. 待平板稍干后，倒置平板并于 37℃ 培养 12–16 小时。

蛋白表达步骤:

1. 挑取单菌落，接种到含 5ml 含抗生素的 LB 培养基中过夜培养。
2. 第 2 天用 0.1 ml 过夜培养物（1:50 比例接菌）接种到 5 ml 含抗生素的 LB 培养液中。
3. 37℃，200 rpm 震荡培养细菌至对数生长期（OD₆₀₀=0.4–0.8）。
4. 每管中加入 IPTG 到终浓度为 0.4 mM，IPTG 浓度诱导 4 小时。
5. 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，明确产物的表达状况（可溶性或不溶性表达）。
6. 大规模诱导培养，制备 1 升含有抗生素的液体培养基，用新生长的菌落或 10 毫升新生长的培养物接种。在 37℃ 下培养，直到 OD₆₀₀ 达到 0.4–0.8。加入终浓度为 0.4 mM 的 IPTG，使用小规模试验中确定的最佳时间/温度表达蛋白质。不同蛋白表达的最佳条件有所不同，需在实验中优化。