



BL21-Cpn-pRARE2 大肠杆菌化学感受态细胞

产品信息:

组成	BC230-01
BL21-Cpn-pRARE2 大肠杆菌化学感受态细胞	10×100 μL
pUC19 (0.1ng/μL)	10 μL

储存条件: -70°C保存, 避免反复冻融。

产品说明:

BL21-Cpn-pRARE2 菌株来源于 BL21, 缺失细胞质蛋白酶 Lon 和外膜蛋白酶 OmpT, 有助于减少重组蛋白的降解。该菌株携带庆大霉素抗性质粒, 可稳定表达来自海洋细菌 *Oleispira antarctica* 的两种低温分子伴侣 Cpn10 (约 10 kDa) 和 Cpn60 (约 57 kDa)。在 4–12°C 低温条件下, 这两种伴侣蛋白的活性高于大肠杆菌自身的 GroEL/GroES, 能够更有效地促进重组蛋白的正确折叠, 从而提高其可溶性、产量和生物活性。该菌株不表达 T7 RNA 聚合酶, 适用于非 T7 启动子驱动的表达载体 (如 pGEX、pMal 和 pTrc 系列)。此外, 菌株还携带氯霉素抗性的 pRARE2 质粒, 可提供 7 种大肠杆菌稀缺的密码子 (AUA、AGG、AGA、CUA、CCC、GGA 和 CGG) 对应的 tRNA, 从而提升外源基因, 尤其是富含稀有密码子的基因的表达水平。BL21-Cpn-pRARE2 感受态细胞经特殊工艺制备, 以超螺旋 pUC19 质粒检测, 转化效率大于 1×10^7 cfu/μg DNA。

基因型: *F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (cpn10 cpn60 Gent^R) pRARE2 (Cam^R)*

菌株抗性: 具有庆大霉素和氯霉素抗性; 对氨苄青霉素、卡那霉素及壮观霉素敏感。

质粒转化步骤

1. 将感受态细胞置于冰水浴中解冻。刚融化后, 加入质粒 DNA 或 5–10 μL 连接产物, 用手指轻弹管底, 使混合均匀。
2. 冰水浴静置 30 分钟, 避免晃动。
3. 42°C 热激 60 秒, 期间勿晃动。
4. 迅速转移至冰水浴, 静置 2 分钟, 勿晃动。
5. 加入 500 μL 无菌 SOC 或 LB 培养基。
6. 置于 37°C 摇床, 150–200 rpm 振荡复苏培养 60 分钟。
7. 取 50–100 μL 菌液涂布于含相应抗生素的 LB 平板上。待液体吸收后, 倒置平板, 于 37°C 培养 12–16 小时。

(可选平板划线分离法: 复苏培养结束后, 12,000 rpm 离心 30 秒, 弃上清, 保留约 100 μL 液体, 用 200 μL 枪头轻轻吹散菌体沉淀。取 10–50 μL 菌液分点滴于平板上, 再用枪头侧面将液滴来回划线。此法可获得更大的单克隆菌落。)

蛋白表达步骤

1. 挑取单菌落, 接种于 5 mL 含 20 μg/mL 庆大霉素、30 μg/mL 氯霉素及相应表达质粒筛选抗生素的 LB 培养基中, 于 37°C、200–250 rpm 振荡培养过夜。
2. 次日, 取 100 μL 过夜培养物转接至 5 mL 新鲜培养基 (含上述抗生素), 于 30°C、220–250 rpm 振荡培养至 OD600 达 0.5–1.0。
3. 将培养物转移至 10–13°C 摇床, 或直接在摇床中降温至 10–13°C, 平衡至少 15 分钟。随后加入 IPTG 至终浓度 1 mM (终浓度及诱导时间需根据目标蛋白优化), 在 10–13°C、220–250 rpm 条件下诱导培养 24 小时。
4. 诱导结束后, 离心收集菌体。通过 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色、Western Blot 或酶活性测定等方法, 分别分析菌体裂解液的总蛋白、上清及沉淀组分, 以评估目标蛋白的可溶性表达情况。
5. 大量表达时, 可按 1:100 比例将过夜培养物转接至 1 L 培养基, 培养至 OD600 达 0.4–0.8 后, 加入 IPTG, 于 10–13°C 诱导过夜 (约 24 小时)。不同蛋白的最佳诱导条件 (如 IPTG 浓度、温度及时间) 可能存在差异, 建议在实验前进行条件优化。