天净沙系列

CAT#:26-038

干冰运输、-80℃保存

天净沙

大肠杆菌 BL21(AI)化学感受态细胞

E. coli BL21(AI) Chemically Competent Cells

使用手册 V0.8

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品是大肠杆菌BL21(AI)化学感受态细胞，是大肠杆菌B/r型菌株，来源于BL21菌株。BL21(AI)感受态细胞适用于任何以T7启动子为基础的表达载体，能够进行高水平的重组蛋白表达；因为菌株能够对体内的T7 RNA聚合酶水平进行高效调节，BL21(AI)感受态细胞能够表达对其他BL21细胞有毒性或抑制生长的蛋白。

该菌株的基因型为：F- *ompT hsdS*$_B$($r_B^-m_B^-$) *gal dcm ara*B*::T7 RNAP-tet*A

本产品具有以下特点：

1. 本产品为Lon蛋白酶和膜外蛋白酶OMPT的缺陷型菌株，这两种酶的缺失有效防止异源蛋白在大肠杆菌体内的降解。
2. 在培养基中添加L-阿拉伯糖可诱导araBAD启动子下游T7 RNA聚合酶的表达进而促进目的蛋白的表达。在培养基中添加葡萄糖可抑制 araBAD 启动子下游 T7 RNA聚合酶的表达进而抑制目的蛋白的表达。
3. 普通重组蛋白在BL21(AI)菌株中获得产量和其他BL21菌株产量相当；而对大部分毒性蛋白，在 BL21(AI)菌株中获得的产量高于 BL21(DE3)pLysS 菌株或BL21(DE3)菌株
4. pUC19质粒（2686 bp，Amp^R）检测转化效率>1E8 cfu/μg DNA
5. 本产品足够10次100 μL的转化实验。
6. 本产品只可用于科研。

规格及成分

本产品采用logo热封袋包装

成分	编号	规格	包装
大肠杆菌BL21(AI) 化学感受态细胞	26-038a	100 μL×10	1.5 mL本色管
pUC19（10 pg/μL）	26-038b	10 μL	1.5 mL本色管
使用手册	26-038sc	1 份	无

运输及保存

干冰运输，-80℃保存，有效期为6个月

自备物品

质粒，EP管，0.9% NaCl。

使用方法

操作方法：

1. BL21(AI)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，迅速放回冰上并静置2分钟，晃动会降低转化效率。
3. 向离心管中加入700 μL不含抗生素的无菌培养基（2YT或LB），混匀后37℃，200×g复苏60 min。
4. 5000×g离心一分钟收菌，留取100 μL左右上清轻轻吹打重悬菌块并涂布到含相

应抗生素的 2YT 或 LB 培养基上。

5. 将平板倒置放于 37℃培养箱过夜培养。

注意：

1. Brian Caliendo（Voigt 实验室）报道过 pCP20 质粒比较难于转化到这个感受态细胞中，而 pCP20 转化到其他菌株中都很正常，但是具体原因未知。
2. 不加葡萄糖，BL21(AI)细胞的 araBAD 启动子下游的本底蛋白表达水平仍然很低，加入葡萄糖后能够进一步的降低本底蛋白的表达水平。

蛋白小量诱导表达：

6. 小摇接菌：在透气试管或透气离心管中准备 1-3 mL 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。
7. 37℃，200×g 过夜摇菌约 10-15 h。
8. 大摇接菌:将第一步的小摇菌液按 1-2%比例接菌到 50 mL 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 500 mL 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）。
9. 37℃，150×g 摇菌到 OD600 值为 0.5-0.8（一般需要 2-4 h）。
10. 空白对照取样（可选步骤）：在加入诱导剂 IPTG 前可取样 1 mL 菌液到 1.5 mL 离心管中，12000×g 离心 10 分钟，弃上清，沉淀放-20℃保存待用。
11. 第四步的三角瓶中加入 IPTG 至终浓度为 1 mM（IPTG 浓度可自由调整），加入过滤除菌的 L-阿拉伯糖至终浓度为 0.2%，继续 37℃，120×g 摇菌 2-4 h。
12. 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 2 h，4 h，6 h，8 h，14 h 取样，离心后放-20℃保存）。
13. 离心收菌：三角瓶从摇床拿出，埋入冰中 10 分钟，4℃，5000×g，10 分钟离心，弃上清，沉淀保存在-20℃。
14. 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：

15. 2.38 g IPTG 加入无菌的双蒸水 10 mL,完全溶解后用 0.22 μm 的滤膜过滤除菌。

注意事项：

16. 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，混入质粒时应轻柔操作。
17. 转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。
18. 诱导时，IPTG 浓度可选（0.1-2 mM 均可），若蛋白表达载体使用 T7 启动子诱导表达，需要在培养基中同时加入终浓度为 0.2%的 L-阿拉伯糖。

	19．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。 **建议选择该菌株进行蛋白表达的条件如下：** 20．使用 T7 启动子载体（高拷贝或者低拷贝都可以）进行蛋白表达。 21．使用其他 BL21 菌株进行蛋白表达时，观察到明显的细菌生长的抑制作用。 22．表达一个已知的毒性蛋白。
关联产品	大肠杆菌 S17-1 λpir 化学感受态细胞

20260729qjy