

## BL21 Chemically Competent Cell 产品说明书

### ● 产品规格 (CAT#: EC1001)

BL21 Competent Cell	100μl /支
pUC19 (control vector, 10pg/μl)	10μl
保存条件 (保质期):	-80°C (6个月)

### ● 基因型

*E. coli* B F<sup>-</sup> dcm ompT hsdS<sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal [malB<sup>+</sup>]<sub>K-12</sub>(λ<sup>S</sup>)</sub>

### ● 产品说明

BL21 是最早开发的用于原核表达的菌株, BL21 (DE3)、Rosetta、OrigamiB (DE3) 等一系列原核表达菌株均来源于 BL21。该菌株主要用于非毒性蛋白的表达, 不含 T7 RNA 聚合酶, 所以不能用于由 T7 启动子驱动的蛋白表达 (如: pET 系列); 但含有大肠杆菌 RNA 聚合酶, 可以用于 tac 或 trc 等使用大肠杆菌 RNA 聚合酶的原核系统的表达 (如: pGEX, pMAL 质粒)。BL21 感受态细胞由特殊工艺制作, pUC19 质粒 (2686bp, Amp<sup>R</sup>) 检测转化效率 > 10<sup>7</sup> cfu/μg DNA。

### ● 操作方法

1. BL21 感受态细胞从 -80°C 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°C 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°C, 200 rpm 复苏 60 分钟。
4. 5000 rpm 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°C 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 (唯地 CAT# : CM1018L)、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。以质粒 pet32a 为例：在 TB 营养液中过夜培养的菌体浓度约为 LB 的 3-5 倍，SOB 的 2-3 倍。
2. 37°C，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°C，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°C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°C，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°C保存)。
8. 离心收菌：三角瓶从摇床拿出，埋入冰中 10 分钟，4°C，5000g，10 分钟离心，弃上清，沉淀保存在-20°C。
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 (唯地 CAT#: YC8022) :

- 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. 混入质粒时应轻柔操作。
3. 转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。
4. 诱导时，IPTG 浓度可选 (0.1-2 mM 均可)。
5. 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。