

BL21(AI) Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT# : EC1004)

BL21(AI) 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

F⁻ ompT hsdS_B(r_Bm_B⁻) gal dcm araB::T7RNAP-tetA

● 产品说明

BL21(AI)是大肠杆菌 B/r 型菌株(E.coli B/r), 来源于 BL21 菌株, 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。在培养基中添加 L-阿拉伯糖可诱导 *araBAD* 启动子下游 T7RNA 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 T7RNA 聚合酶的表达进而抑制目的蛋白的表达。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。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; 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。BL21(AI) 感受态细胞由特殊工艺制作, pUC19 质粒 (2686bp, Amp^R) 检测转化效率>10⁸ cfu/μg DNA。

● 操作方法

1. BL21(AI)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。

● 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 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、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，37°C，200 rpm 过夜摇菌约 10-15h。
2. 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）。37°C，150 rpm 摇菌到 OD600 值为 0.5-0.8（一般需要 2-4h）。
3. 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。
4. 第三步的三角瓶中加入 IPTG 至终浓度为 1mM（IPTG 浓度可自由调整），加入过滤除菌的 L-阿拉伯糖（唯地 CAT#：C1040）至终浓度为 0.2%，继续 37°C，120 rpm 摇菌 2-4h。

L-阿拉伯糖的浓度决定 T7RNA 聚合酶的丰度，L-阿拉伯糖的浓度越高，细胞内 T7RNA 聚合酶越多，目标蛋白 mRNA 的转录越快，蛋白的翻译也越快，有利于目标蛋白产量的提高，但同时会增加形成包涵体的概率。若目标蛋白合成正常但在包涵体中比例过高，可溶蛋白比例偏低，可以考虑降低营养液中 L-阿拉伯糖的浓度，L-阿拉伯糖浓度的可调节范围为 0.05%-0.5%；若目标蛋白无法诱导或诱导条带偏弱，可以考虑提高诱导时营养液中 L-阿拉伯糖的浓度，诱导不同蛋白的最佳阿拉伯糖浓度需要实验者优化。实验者也可在调高 L-阿拉伯糖浓度的同时提高 IPTG 浓度；在调低 L-阿拉伯糖浓度的同时降低 IPTG 浓度（IPTG 浓度的可调节范围为 0.1-20mM）。

5. 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）。
6. 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。
7. 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，混入质粒时应轻柔操作。转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。
2. 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。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：

1. 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。
2. 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。
3. 表达一个已知的毒性蛋白。