

BL21-Gold

Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: EC2111)

BL21-Gold 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⁻ *ompT* *hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^r *gal* endA Hte

● 产品说明

BL21-Gold 菌株来源于 Stratagene 公司的 BL21 菌株, 缺少 Lon 蛋白酶和 OmpT 蛋白酶, 减少对重组蛋白的降解。BL21-Gold 菌株的染色体中整合了一个有功能的 Dcm 甲基化酶, 可以促进质粒的稳定, 防止被自身的限制酶系统降解; 引入了 Hte 基因, 可以提高转化效率; 缺失核酸内切酶 (endA), 提高了质粒 DNA 的产量、质量和稳定性。BL21-Gold 菌株不含 T7 RNA 聚合酶, 在不引入外源 T7 RNA 聚合酶时不能用于由 T7 启动子驱动的表达 (如: pET 系列); 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); 通过感染 CE6 噬菌体可将 T7 RNA 聚合酶引入 BL21-Gold, 诱导 T7 启动子驱动的表达 (如: pET 系列), 这种方法完全没有泄漏表达, 可以用于表达毒性基因。BL21-Gold 感受态细胞具有四环素抗性, 由特殊工艺制作, pUC19 质粒 (2686bp, Amp^R) 检测转化效率 > 5 × 10⁸ cfu/µg DNA。

● 操作方法

1. BL21-Gold 感受态细胞从 -80°C 拿出, 迅速插入冰中, 5 分钟后待菌块融化或处于冰水混合状态时加入目的质粒, 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, 迅速放回冰中并静置 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、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。
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）。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。
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，混入质粒时应轻柔操作。
2. 转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。
3. 诱导时，IPTG 浓度可选（0.1-2 mM 均可）。
4. 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。