

TKB1 Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: EC2070)

TKB1 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- *dcm ompT hsdS*(*r_B-m_B*-)*gal* λ(DE3) [pTK Tet^R]

● 产品说明

TKB1 是 BL21(DE3)菌株的衍生菌株, 广泛用于蛋白的原核表达实验, 该菌株表达的蛋白可以在潜在的酪氨酸位点完成磷酸化, 提高原核表达蛋白的可溶性和有功能蛋白的大量纯化。将酪氨酸激酶 Tyrosine Kinase(TK)基因连入可诱导的启动子构建质粒, 并将该质粒命名为 pTK: pTK 质粒转入 BL21(DE3)菌株, 命名为 TKB1 菌株。TKB1 为 Lon 和 OmpT 蛋白酶缺陷型菌株, 可促进表达蛋白的稳定; 同时该菌株染色体整合了λ噬菌体 DE3 区 (DE3 区含有 T7 噬菌体 RNA 聚合酶, 整合于大肠杆菌的染色体上), 可同时表达 T7 RNA 聚合酶和大肠杆菌 RNA 聚合酶, 用于 pET 系列, pGEX, pMAL 等质粒的蛋白表达。TKB1 感受态细胞由特殊工艺制作, pUC19 质粒 (2686bp, Amp^R) 检测转化效率 > 1 × 10⁷ cfu/μg DNA。

● 操作方法

1. TKB1 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 (培养基中除了加转化质粒的筛选抗生素, 还要加入四环素: 终浓度 10μg/ml) 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。

● 磷酸化蛋白的两步诱导(仅供参考)

一. 目的蛋白的 IPTG 诱导表达

1. 新鲜的平板, 挑选独立的菌落接种到 LB+筛选抗生素+四环素(10 μ g/ml) 液体培养基 2ml (用>10ml 的圆底试管或蓝盖管) 中, 37 $^{\circ}$ C, 200 rpm 摇菌 10-15h。
2. 第一步的小摇菌液按 1% 的比例接种到适量 LB+筛选抗生素+四环素(10 μ g/ml) 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 150-200 rpm 摇菌到 OD 600 为 0.6-0.8 之间时停止。
3. 加入适量 IPTG, IPTG 终浓度在 0.4-5mM 之间即可, 在适当的温度, 200 rpm 摇菌。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。

二. 酪氨酸激酶的诱导表达和目的蛋白的磷酸化

4. 2000 \times g 离心收集第三步菌体, 重悬在 TK 诱导培养基+筛选抗生素+四环素(10 μ g/ml)中, 调整菌体浓度在 OD 600 为 0.5, 37 $^{\circ}$ C, 200 rpm 摇菌 2h。
5. 2000 \times g 离心收集菌体, 可做后续的 SDS-PAGE, 染色, Western Blot 分析, 也可放-20 度长期保存。

● TK 诱导培养基的配制

Modified 5 \times M9 Medium (1L)	
Na ₂ HPO ₄	30 g
KH ₂ PO ₄	15 g
NH ₄ Cl	5 g
NaCl	2.5 g
CaCl ₂	15 mg
	121 度高压灭菌

1 \times TK 诱导培养基 (1L)	
modified 5 \times M9 medium(高压灭菌)	200 ml
1 M MgSO ₄ ·7H ₂ O (高压灭菌)	1 ml
20% (w/v) glucose (0.45 μ m 过滤)	10 ml
20% casamino acids(0.45 μ m 过滤)	5 ml
0.5% thiamine - HCl (0.45 μ m 过滤)	0.1 ml
2.5 mg/ml indoleacrylic acid (0.45 μ m 过滤)	4 ml
	补水到 1L

● IPTG, 四环素的配制

抗生素	配制方法	原液	工作液
IPTG (唯地 CAT#: YC8022)	双蒸水溶解, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌	1 M	0.4-10mM
四环素 (tet) (唯地 CAT#: YC9050)	无水乙醇溶解, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌	20 mg/ml	10 μ g/ml

● 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, 长时间存放会降低转化效率。
2. 转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。
3. 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。
4. TKB1 菌株具有四环素抗性, 不可用于具有四环素抗性质粒的转化, 携带 pTK 质粒, 除复苏培养基为无抗生素外, 其余所用培养基、培养液均应含有 10 μ g/ml 四环素, 以防质粒丢失。