

### BL21(DE3)-Cpn10-Cpn60 protocol 产品说明书

#### ● 产品规格 (CAT#: ECC0108)

BL21(DE3)-Cpn10-Cpn60 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<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm(DE3) [cpn10cpn60 Gent<sup>r</sup>]

#### ● 产品说明

BL21(DE3)-Cpn10-Cpn60, 是含有 Cpn10, Cpn60 两种分子伴侣的 BL21(DE3)。Cpn10 和 Cpn60 是来自嗜冷菌的伴侣蛋白, 在 4-12°C 表现出较高活性, 在 BL21(DE3) 细胞中表达时, 可辅助外源蛋白折叠, 形成正确构象, 减少重组蛋白包涵体的形成, 增加可溶重组蛋白的表达量及生物活性, 在低温时比传统的原核表达伴侣蛋白 GroEL、GroES 等具有更加优异的促融性能。BL21(DE3)-Cpn10-Cpn60 菌株基因组中整合了 λ 噬菌体 DE3 区 (含有 T7 噬菌体 RNA 聚合酶) 可同时表达 T7 RNA 聚合酶和大肠杆菌 RNA 聚合酶, 可用于 pET 系列, pGEX, pMAL 等质粒的蛋白表达。BL21(DE3)-Cpn10-Cpn60 菌株具有庆大霉素抗性, 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 > 1 × 10<sup>7</sup> cfu/μg DNA。

#### ● 操作方法

1. 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, 迅速放回冰中静置 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 50μl 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, 将平板倒置放于 37°C 培养箱过夜培养。

#### ● 抗生素使用方法

BL21(DE3)-Cpn10-Cpn60 感受态含有具有庆大霉素抗性的分子伴侣共表达质粒, 转化原核表达质粒时, 需同时在培养基中加入 20ug/ml 的庆大霉素和原核表达质粒所带抗性抗生素进行筛选和诱导。

#### ● 抗生素使用浓度

抗生素名称	配方	原液	工作液
羧苄青霉素 (carb) (唯地 CAT#: YC9040)	双蒸水溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	50 μg/ml
硫酸卡那霉素 (kan) (唯地 CAT#: YC9020)	双蒸水溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	50 μg/ml
氯霉素 (Cam) (唯地 CAT#: YC9030)	无水乙醇溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	20 μg/ml
庆大霉素 (Gent) (唯地 CAT#: YC9090)	双蒸水溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	20 μg/ml

### ● 共表达分子伴侣，诱导目标蛋白操作步骤

#### 一. BL21(DE3)-Cpn10-Cpn60 感受态诱导目标蛋白方法:

1. 筛选平板长出的菌落，接种到大于 20ml 的透气试管（加入 2ml 含相应抗生素的 LB）中，37°C，200rpm 小摇 10-16h。
2. 小摇菌液变浓之后，按 1-2% 的比例接种到大摇瓶中（20ml 以上含相应抗生素的 LB；使用透气三角瓶；营养液的体积最好控制在三角瓶标定体积的 10%-20% 之间），37°C，200rpm 摇菌直到菌液 OD600=0.45-0.65 时，加入终浓度 1mM 的 IPTG，继续培养。
3. 可 37°C 也可低温诱导（若低温诱导，需将菌液埋入冰中静置 1-6min，充分降温到目标温度后再加入 IPTG），也可在 0.1-20mM 范围内调整 IPTG 浓度。不同蛋白原核表达的最佳诱导温度，时间，诱导剂浓度需实验者优化。

附言：Cpn10、Cpn60 分子伴侣在低温时活性更高，温度越高活性越低，最适温度为 4-12 度，其次 12-25 度。

#### 二. 自诱导培养基诱导目标蛋白方法:

1. 小摇：参考以上菌株对应抗生素添加抗生素，37°C，200 rpm 过夜摇菌约 10-24h，菌体摇浓，一般要求 OD600>2.0。
2. 按 2-5% 的比例接种到 AIM-2YT Broth 自诱导培养基中，
  - A. 30-37 度诱导：200-300rpm，摇菌 8-24h。
  - B. 18-25 度诱导：200-300rpm，摇菌 12-48h。
  - C. 若所表达蛋白为毒性蛋白，可先在 37 度摇菌，待菌体 OD600=0.8 左右时降温到目标温度开始诱导蛋白表达。
3. 最佳摇菌时间与所表达蛋白有关，为找到最佳诱导时间可在不同诱导时间点取样。

### ● 分子伴侣的大小及检测

1. Cpn10: 10 kDa 左右，Cpn60: 60 kDa 左右。
2. 在 SDS-PAGE 凝胶电泳时，大部分情况可以看到共表达的分子伴侣条带，但 10kDa 条带并不清晰；若表达的目标蛋白影响了大肠杆菌的细胞周期和表达谱，有些分子伴侣表达量会下降，可能看不到相应的分子伴侣条带或条带较弱。

### ● 相关产品货号

IPTG 溶液 (1M, 过滤除菌), 货号: YC8022	LB 固体, 货号: CM1010S	LB 液体, 货号: CM1010L
高密度 LB 液体培养基, 货号: CM1310L	2YT 液体, 货号: CM1016L	TB 液体, 货号: CM1018L
AIM-LB 自诱导培养基, 货号: AIM1014L	AIM-2YT 自诱导培养基, AIM1016L	ZYM-5052 液体, AIM1031L

### ● 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 浓度可在 0.1-20 mM 之间优化，最佳诱导时间，温度，IPTG 浓度需实验者优化。
3. 分子伴侣诱导剂 I (100×) 在 4°C 可稳定保存 12 个月；放 -20°C 可稳定保存 24 个月。