SHuffle T7 Express E. coli B-KJE-EL-ES-TIG Competent Cell 产品说明书

● 产品规格（CAT#：ECC3107）

产品组分	规格	货号 ECC3107S	货号 ECC3107M	保存条件/时间
SHuffle T7 Express E. coli B-KJE-EL-ES-TIG Competent Cell	100μl /支	10 支	50 支	-80℃（6 个月）
pUC19 (control vector, 10pg/μl)	10μl	1 支	1 支	-80℃（36 个月）
分子伴侣诱导剂 I（100×）	5ml/支	1 支	3 支	4℃（12 个月）

● SHuffle T7 Express E. coli B 基因型 *fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT ahpCgal λatt::pNEB3-r1-cDsbC* (Spec^R, lacI^q) *ΔtrxB sulA11 R(mcr-73::miniTn10*--Tet ^{S}) *[dcm] R(zgb-210::Tn10* --Tet ^{S}) *endA1 Δgor Δ(mcrC-mrr)114::IS10* [DnaK/J GrpE EL ES TIG CamR]

● 产品说明

SHuffle T7 Express E. coli B-KJE-EL-ES-TIG，是含有 DnaK、DnaJ、GrpE、EL、ES、TIG 六种分子伴侣的 SHuffle T7 Express E. coli B。DnaK、DnaJ、GrpE、EL、ES、TIG 是来自大肠杆菌的伴侣蛋白，在 18-37℃表现出较高活性，在 SHuffle T7 Express E. coli B 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。SHuffle T7 Express E. coli B-KJE-EL-ES-TIG 的染色体中整合了一个拷贝的二硫键异构酶 DsbC 基因 ，可以促进含有二硫键蛋白的正确折叠；此外 DsbC 还是一个分子伴侣，可以帮助不含二硫键蛋白正确折叠，形成正确构象，同时该菌株缺少 Lon 蛋白酶和 OmpT 蛋白酶，可减少重组蛋白的降解。SHuffle T7 Express E. coli B-KJE-EL-ES-TIG 菌株染色体中同时整合了一个拷贝的 T7 RNA 聚合酶基因，可以表达噬菌体 T7 RNA 聚合酶，适合于 T7 启动子诱导的蛋白表达；该菌株还可以表达大肠杆菌 RNA 聚合酶，所以可用于 pET 系列，pGEX，pMAL 等质粒的蛋白表达。SHuffle T7 Express E. coli B-KJE-EL-ES-TIG 菌株具有抗 T1 噬菌体感染的特点，具有链霉素、壮观霉素、氯霉素抗性。SHuffle T7 Express E. coli B-KJE-EL-ES-TIG 感受态细胞由特殊工艺制作，pUC19 质粒（2686bp，Amp^R）检测转化效率>10^8 cfu/μg DNA。

● 操作方法

1. 感受态细胞从-80℃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℃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℃，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℃培养箱过夜培养。

● 抗生素使用方法

SHuffle T7 Express E. coli B-KJE-EL-ES-TIG 感受态含有具有氯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．SHuffle T7 Express E. coli B-KJE-EL-ES-TIG 感受态诱导目标蛋白方法：

1. 筛选平板长出的菌落，接菌到大于 20ml 的透气试管（加入 2ml 含相应抗生素的 LB）中，37℃，200rpm 小摇 10-16h。

2. 小摇菌液变浓之后，按 1-2%的比例接菌到大摇瓶中（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℃，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℃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：DnaK、DnaJ、GrpE、EL、ES、TIG 分子伴侣来自大肠杆菌，在 18-37 度活性更高，温度越高活性越高，最适为 25-37 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℃，200 rpm 过夜摇菌约 10-24h，菌体摇浓，一般要求 OD600>2.0。

2. 按 2-5%的比例接菌到 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，检测及相关产品货号

1. DnaK：70 kDa 左右，DnaJ：40 kDa 左右，GrpE：20 kDa，EL：60 kDa 左右，ES：10 kDa 左右，TIG：60 kDa。

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，20kDa 条带并不清晰；若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。

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℃可稳定保存 12 个月；放-20℃可稳定保存 24 个月。