

SHuffle T7 Express E. coli B-Cpn10-Cpn60 Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: ECC3108)

SHuffle T7 Express E. coli B-Cpn10-Cpn60	100μl /支
pUC19 (control vector, 10pg/μl)	10μl
保存条件 (保质期):	-80°C (6个月)

● SHuffle T7 Express E. coli B 基因型 *fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT ahpC gal latt::pNEB3-r1-cDsbC (Spec^R, lacI^R) ΔtrxB sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10 --Tet^S) endA1 Δgor Δ(mcrC-mrr)114::IS10[cpn10cpn60 GentR]*

● 产品说明

SHuffle T7 Express E. coli B-Cpn10-Cpn60, 是含有 Cpn10, Cpn60 两种分子伴侣的 SHuffle T7 Express E. coli B。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 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, 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。SHuffle T7 Express E. coli B-Cpn10-Cpn60 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, 可减少对重组蛋白的降解。SHuffle T7 Express E. coli B-Cpn10-Cpn60 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-Cpn10-Cpn60 菌株具有抗 T1 噬菌体感染的特点, 具有链霉素、壮观霉素、庆大霉素抗性。SHuffle T7 Express E. coli B-Cpn10-Cpn60 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. 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

SHuffle T7 Express E. coli B-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-Cpn10-Cpn60 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°C, 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°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. 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.

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.