

WB800 Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格和内容

产品内容	货号: Bsc1035S	货号: Bsc1035M	保存条件/时间
WB800 Competent Cell	100μl/ 10 支	100μl/ 50 支	-80℃ (6 个月)
pP43NMK (control vector, 10 ng/μl)	10μl/ 1 支	10μl/ 1 支	-80℃ (6 个月)
枯草繁育培养基 BsLB	500μl/ 1 支	1.5ml/ 1 支	常温 (6 个月)

● 基因型: trpC2 ΔnprE ΔaprE Δepr Δbpr Δmpr::ble ΔnprB::bsr Δvpr wprA::hyg

● 产品说明

枯草芽孢杆菌是革兰氏阳性菌，细胞壁不含脂多糖（LPS），表达的蛋白无需额外去除内毒素，适合医药或食品级应用；天然具有高效的分泌系统，可将目标蛋白直接分泌到培养基中，简化纯化步骤；多数情况下无包涵体问题，表达的可溶性蛋白正确折叠，尤其适合含二硫键的蛋白（胞外环境有助于氧化折叠）；培养简单，生长快，普通 LB 培养基、37℃振荡即可快速生长，发酵工艺成熟。WB800 菌株是常用的多重蛋白酶缺陷株，是 WB600 的衍生菌株，比 WB600 多敲除两个蛋白酶，共有 8 个主要蛋白酶基因被突变，其胞外蛋白酶活性仅剩野生型的 0.06%，能有效减少外源蛋白被降解，提高外源蛋白产量和稳定性。WB800 的 trpC 基因发生 3 bp 缺失突变，突变后菌株无法自身合成色氨酸（由于编码区缺失了 3 个碱基 ATT，trpC 基因编码的蛋白质在第 110 和 111 位氨基酸位置，由原来的两个异亮氨酸减少为一个异亮氨酸）。WB800 基因组中整合了一个博来霉素抗性基因，一个杀稻瘟素抗性基因，一个潮霉素抗性基因，有博来霉素、杀稻瘟素、潮霉素抗性，同时 WB800 基因组中有氯霉素抗性基因，不可转化氯霉素抗性质粒。唯地生物开发的 WB800 化转感受态细胞只能用于热激转化，不能用于电击转化，经特殊工艺制作，pP43NMK 质粒（7683bp）检测转化效率 $>1 \times 10^2$ cfu/μg DNA。

● 操作方法

1. WB800 感受态细胞从-80℃拿出，迅速插入冰中，待感受态融化，加入目的质粒并用手拨打 EP 管底混匀。
2. EP 管插入浮漂中，放 37℃孵育 1 小时。
3. 每管加入 20ul 枯草繁育培养基 BsLB，混匀后继续放 37℃孵育 1-2 小时。
4. 拿出 EP 管，5000 rpm 离心一分钟收菌，留取 50 μl 左右上清轻轻吹打重悬菌块并涂布到含相应抗生素的 LB 平板上。将平板倒置放于 37℃培养箱过夜培养至少 15 小时。

● 抗生素使用浓度：

1. WB800 具有氯霉素抗性，不适合转化氯霉素抗性的枯草芽孢杆菌质粒。

2. 卡那抗性的枯草芽孢杆菌表达质粒（PMA5、pP43NMK【唯地货号：PB1101、PB1121】等）使用硫酸卡那霉素进行筛选，WB800 使用的筛选浓度是 50ug/ml(卡那霉素溶液唯地货号：YC9020L)。
3. 不同枯草菌株对抗生素的敏感度不同，不同质粒表达抗性基因的强度有差异，若使用新的质粒转化枯草菌株，所用的抗生素浓度需要做梯度试验确定。

● LB 液体培养基货号：CM1010L；LB 固体培养基货号：CM1010S。

● 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. 加入枯草孵育培养基 BsLB 后，孵育 2 小时的转化效率相比孵育 1 小时可提高 30%。
3. 枯草芽孢杆菌表达系统可用 IPTG 诱导型质粒或木糖诱导型质粒，当用 IPTG 诱导时，尽量使用不含乳糖的原料，若原料（蛋白胨，酵母粉等）中含有乳糖，会有严重的泄露表达（泄露表达是指不加诱导剂时目标蛋白的背景表达，大部分时候不影响试验）。