



T7pLysY 感受态细胞

产品信息:

储存条件: -70℃ 保存, 避免反复冻融。

组成	BC207-01	BC207-02
T7pLysY Competent cells	10×100µl	20×100µl
pUC19 (0.1ng/µl)	5µl	5µl

产品说明:

T7pLysY 菌株为大肠杆菌 BL21 增强型菌株, 为 Lon 和 OmpT 蛋白酶缺陷型, 用于毒性或非毒性蛋白的表达。该菌株区别于 BL21(DE3)pLysS 和 BL21(DE3)pLysE 菌株的优势在于 T7 RNA 聚合酶基因整合在细菌染色体上的 lac 操纵子区域, 基因组中无 λ 前噬菌体序列, LysY 表达的 T7 溶菌酶保留了对 T7 RNA 聚合酶的抑制作用但缺失了水解细胞壁的酰胺酶活性, 有利于降低基因的背景表达和避免诱导过程中细菌的裂解, 菌株具有抗 T1 噬菌体感染等特点。T7pLysY 表达感受态细胞经特殊工艺制作, pUC19 质粒检测转化效率大于 10⁸ cfu/µg。

基因型:

fhuA2lacZ::T7gene1[lon]ompTgalsulA11R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2[dcm]R(zgb-210::Tn10--Tet^S)endA1D(mcrC-mrr)114::IS10 lysY (Cam^R)

菌株抗性: 对氨苄青霉素, 壮观霉素, 卡那霉素, 链霉素和四环素敏感, 对氯霉素有抗性。

质粒转化步骤:

1. 将感受态细胞置于冰水浴中化冻。待细胞刚化冻后, 加入质粒DNA 到细胞中, 用手指拨打管底, 轻轻混匀;
2. 冰水浴中放置15-30 分钟, 不要晃动;
3. 42℃ 热击 60 秒钟, 不要晃动;
4. 冰水浴中放置2 分钟, 不要晃动;
5. 加入 500µl 无菌的 SOC 或 LB 培养基;
6. 置于 37℃ 摇床中, 150-200rpm 震荡复苏培养 60 分钟;
7. 取 50-100µl 菌液涂布在含 34µg/ml 氯霉素及所选质粒筛选抗生素的 LB 平板上。待液体吸干后, 倒置平板, 37℃ 培养 12-16 小时。

(**平板划线分离法:** 复苏培养结束后, 12000rpm 离心 30 秒钟, 弃掉上清, 留 100µl 左右的液体, 用 200µl 吸头轻轻吹打散菌块, 取 10µl 重悬的菌液分多点滴在抗性 LB 平板上, 倾斜吸头, 用吸头头部的侧面将滴在平板上的液体来回划线。37℃ 培养过夜。这个方法可以获得更多更大的单克隆菌落。)

蛋白表达步骤:

1. 挑取单菌落，接种到5ml 含34 μ g/ml 氯霉素及所选质粒筛选抗生素的LB 培养基中。
2. 37 $^{\circ}$ C，200rpm 震荡培养细菌至对数生长期（OD₆₀₀=0.4-0.8）。
3. 加入 IPTG 到终浓度为 0.4mM，37 $^{\circ}$ C 诱导 2-4 小时或 16 $^{\circ}$ C 诱导过夜。
4. 诱导完成后，离心收集菌体，用合适的方法（如考马斯亮蓝染胶法，Western-Blot法或酶活性分析法）分析菌体裂解物的总蛋白、上清和沉淀组分，明确表达产物的表达状况（可溶性或不溶性表达）。
5. 大量表达时，可用 10ml 过夜培养物转接到 1L 培养基中，当培养到 OD₆₀₀=0.4-0.8 时，加入终浓度为 0.4mM 的 IPTG，37 $^{\circ}$ C 诱导 2-4 小时或 16 $^{\circ}$ C 诱导过夜（不同蛋白表达的最佳条件有所不同，需在实验中优化）。

BM190312