



T7 lysY-I^q 感受态细胞

产品信息:

组成	BC223-02
T7 lysY-I ^q Competent cells	20×100μl
pUC19 质粒	5 μl

储存条件: -70°C保存，避免反复冻融。

产品介绍:

T7 lysY-I^q 菌株为大肠杆菌 BL21 增强型菌株，拥有最高水平的 T7 表达控制，用于毒性或非毒性蛋白的表达。该菌株缺乏细胞质蛋白酶 Lon 和外膜蛋白酶 OmpT，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。菌株具备 lacI^q 基因，可产生过量的 lac 阻遏蛋白，与 lacO 序列结合，确保菌株在非诱导情况下 T7 RNA 聚合酶和外源基因不表达。lysY 基因在单拷贝 miniF 质粒上，表达产物 LysY 是 T7 溶菌酶的突变体，结合并抑制 T7 RNA 聚合酶的活性，这种 T7 溶菌酶突变蛋白缺乏酰胺酶活性，在诱导过程中细胞不易裂解。fhuA2 突变赋予菌株抗 T1 噬菌体感染。T7 lysY-I^q 大肠杆菌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:

MiniF lysY lacI^q(Cam^R) / fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2[dcm] R(zgb-210::Tn10--Tet^S) endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10

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

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 30 分钟，不要晃动。
3. 42°C 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 500 μl 无菌的 SOC 或 LB 培养基。
6. 置于 37°C 摇床中，150-200 rpm 震荡复苏培养 60 分钟。
7. 取 50-100μl 菌液涂布在适当浓度的转化质粒的抗性抗生素的 LB 平板上。待液体吸干后，倒置平板，37°C 培养 12-16 小时。
(平板划线分离法: 复苏培养结束后，12,000rpm 离心 30 秒钟，弃掉上清，留 100 μl 左右的液体，用 200 μl 吸头轻轻吹打散菌块，取 10 μl 重悬的菌液分多点滴在平板上，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。这个方法可以获得更多更大的单克隆菌落。)

重组蛋白表达步骤:

1. 挑取单菌落，接种到含 5 ml 带抗生素的 LB 培养基中 (miniF 质粒无需氯霉素维持)。
2. 37°C，200 rpm 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 0.4 mM，37°C 诱导 2-4 小时或 16°C 诱导过夜。
(低温诱导方法: 37°C，200 rpm 震荡培养细菌到 1-2 个 OD 左右，然后将培养物降温至 16-20°C，低温培养 15 分钟达到平衡，将 IPTG 添加到摇瓶中，最终浓度达到为 0.1-0.5 mM 之间。继续诱导培养 12-24 小时。)
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 10 ml 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 0.4 mM 的 IPTG，37°C 诱导 2-4 小时或 16°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)。

20240620