

EcN 1917(T7 RNAP)二代甘油菌种说明书

● 产品规格 (CAT#: Bec-3045)

EcN 1917(T7 RNAP)二代甘油菌	400μl / 1 支	保存: -80°C/大于 10 年
LB 平板	9cm / 2 块	4 度保存/30 天
一次性接种环	4 支	—

● 基因型

EcN 1917 ΔmalEFG lacUV5::T7RNAP O6:K5:H1 EndA⁺ Dcm⁺

● 产品说明

大肠杆菌菌株 Nissle 1917 是一种非致病的共生大肠杆菌分离物, 1917 年由德国微生物学家 Alfred Nissle 从一名未感染痢疾的士兵肠道中分离出一株大肠杆菌, 这个菌株可以作为药物治疗其他感染者, 后来被命名为 Nissle 1917, 通常也缩写为 EcN。EcN 是一株未经过改造的野生型大肠杆菌菌株, 不产生任何肠毒素或细胞毒素 (肠毒素是由某些微生物产生的毒素, 可引起胃肠道症状)。EcN 属血清 O6:K5:H1 型, 其 LPS 侧链较短, 且 K5 型荚膜具有血清敏感性, 在体内易被血清清除, 因此 EcN 不具致病性。EcN 可以抑制肠道内病原菌的生长, 防止病原菌在肠道内定植, 同时具有抗炎作用。EcN 在临床上主要用于胃肠功能障碍性疾病的治疗, 例如克罗恩病、炎症性肠病及便秘等。本公司的 EcN 1917(T7 RNAP)菌株来源于 Mutaflor 的 EcN 益生菌, 是一种非致病性微生物, 食用后可以促进消化系统健康; 该 EcN 菌株胞内含有两个野生型辅助质粒 pMUT1(3173bp)、pMUT2(5514bp), 这两个质粒无已知功能, 无明显的筛选标记, 但在大肠杆菌中可稳定存在, 可作为 EcN 菌株的鉴定标准质粒使用, 也可作为 EcN 菌株的加工平台, 对 pMUT1、pMUT2 进行加工改造可连入外源基因, 可表达蛋白或引入外源小 RNA 分子等。EcN 1917(T7 RNAP) 是在基因组中引入了一个拷贝的 lacUV5 启动子驱动 T7 RNA polymerase/T7 RNAP, 整合到 EcN 的 malEFG 操纵子中, 可以用于各种商业化蛋白表达质粒 (利用 T7 启动子驱动蛋白表达的质粒: pet28a/32a/pGEX/pMAL/pCold 等) 进行蛋白表达, 提高蛋白产量。EcN 菌株核酸酶 endA1 为野生型, 体内核酸酶含量较高, 提取质粒时务必使用质粒提取试剂盒中去蛋白液尽量去除核酸酶对质粒的污染, 防止质粒降解; 另外染色体中携带有功能的 Dcm 甲基化酶; 不可用于蓝、白斑筛选。本产品为二代甘油菌株 (一代种扩增两个世代后保种), 未经过大量扩繁, 核 DNA 及表型稳定, 菌落表型及生长曲线与原种匹配度大于 99.5%。

- 注意: 商业化的原核蛋白表达质粒需要加 IPTG 诱导蛋白表达, T7 启动子本身有很强的泄露表达, 不加诱导剂时也会有很强的本底表达, 比大部分的组成型启动子更高; 如果需要更高表达量的 T7 质粒, 可选用唯地生物改造的非诱导型 T7 高表达质粒 (货号 CAT#: PE9016/PE9017/PE9018/PE9019/PE9020)

● 操作方法

1, 客户收到菌株后, 不可直接吸取菌液接种扩繁。应先对菌种进行复壮, 待长出单菌落后挑单菌落接菌扩繁; 复壮方法如下: 在超净台打开盖子, 用接种环沾取少量甘油菌液采用交叉划线法(图 1) 在 LB 平板表面轻轻划线(注意: 不要刺破培养基), 将平板封口后放 37 度培养 15-20h, 即可长出单菌落。

2, 交叉划线法: 划线的目的是经过几次不连续划线达到梯度稀释菌液的效果, 保证能长出单菌落。具体步骤如下:

A, -80 度取出的甘油菌应在超净台打开盖子, 立即在表面挑取菌液/菌块划线, 不用等融化后划线, 固体状态时即可用接种环挑取划线, 操作要点是“快速操作, 立即划线”, 目的是最大限度减少温度波动对菌种造成的“冷休克”和冰晶物理损伤; 如果收到的是液体甘油菌, 可直接划线, 在超净台打开盖子用接种环沾取少量甘油菌液划线。

B, 取出无菌接种环, 注意不要污染, 图 1 所示为标准的五段交叉划线法, 分五个区, 每个区划三条直线, 第 1、2 区可共用一个接种环, 划好 1, 2 区后换一个新接种环划第 3 区, 再换一个新接种环划第 4 区, 再换一个新接种环划第 5 区, 每一次换接种环划线要经过前面划线区的划线痕迹, 这样就相当于对菌种进行稀释。简易划线也可只划 3 个区或 4 个区。

C, 客户也可用金属接种环灼烧后划线; 本公司提供的接种环为 ABS 材质, 不可灼烧。

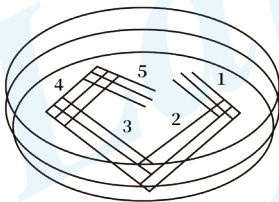


图 1. 五段交叉划线法示意图

● 注意事项

- 1, 客户收到二代甘油菌株后, 应立即放-80 度保存, 不可放-20 度保存。
- 2, 应减少甘油菌冻融的次数, 冻融的次数越多, 菌种的活力越低;
- 3, 若扩繁菌种, 注意一次扩繁不要超过四个世代, 以保证菌种基因组的稳定; 扩增后重新保存的菌种必须对菌种做表型、功能验证, 所有表型、功能保持完好的菌株才能作为菌种使用。