

### WB800N Electroporation-Competent Cell 产品说明书

#### ● 产品规格和内容

产品内容	货号: BsE1030S	货号: BsE1030M	保存条件/时间
WB800N Competent Cell	100μl/ 5 支	100μl/ 20 支	-80°C (6 个月)
pHT10 (control vector, 10 ng/μl)	10μl/ 1 支	10μl/ 1 支	-80°C (6 个月)

● 基因型: nprE aprE epr bpr mpr::ble nprB::bsr Δvpr wprA::hyg cm::neo; NeoR

#### ● 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°C 振荡即可快速生长，发酵工艺成熟。WB800N 菌株是应用最广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。WB800N 菌株同时具有潮霉素和新霉素抗性，“N”代表“Non-sporulating”（不产芽孢），野生型枯草芽孢杆菌在营养匮乏或培养后期会启动产孢程序，形成高度耐受的芽孢，这对于外源蛋白表达是不利的，因为：产孢过程会启动大量胞内蛋白酶，可能降解目标蛋白；菌体形态和代谢发生巨大变化，影响蛋白产量的稳定性；孢子一旦形成，不利于下游纯化（孢子难以裂解）。因此，不产孢的 WB800N 能将全部代谢资源用于细胞生长和蛋白合成，更适合作为重组蛋白表达的宿主。WB800N 电击感受态细胞只能用于电击转化，不能用于热激转化，经特殊工艺制作，pHT10 质粒（5850bp）检测转化效率  $>1 \times 10^4$  cfu/μg DNA。

#### ● 操作方法

1. 取适量 2YT 放 37 度预热 1 小时（每管感受态准备 1ml 2YT）。
2. 0.2 cm 电击杯和杯盖从储存液中拿出倒置于干净的吸水纸上 5 分钟沥干水分，正置 5 分钟，待乙醇挥发干净立即插入冰中，压实冰面，电击杯顶离冰面 0.5 cm 以方便盖上杯盖，冰中静置 5 分钟充分降温。
3. 取 -80°C 保存的 WB800N 电击感受态细胞插入冰中 5 分钟，待其融化，加入目的 DNA，用手拨打 EP 管底轻轻混匀，避免产生气泡，立即插入冰中。
4. 用 200 μl 枪头(用刀切除 0.5cm 枪尖)轻轻吹吸两次混匀，将感受态-DNA 混合物快速移到电击杯中（避免产生气泡），轻轻晃动使液面保持水平状态，盖上杯盖，插入冰中。
5. 启动电转仪，设置参数：C=25 μF，PC=200 Ω，V=2.1 kV，将电击杯从冰中拿出，用吸水纸擦拭表面，吸干表面水渍，放入电转槽中，电击完成后拿出电转杯放室温，打开杯盖，快速加入 1ml 预热的 2YT，用 1ml 枪吹吸电击杯底部 2-3 次，混匀后转移到 1.5 ml 离心管，37°C，150 rpm 复苏 3 小时。

6. 可直接取 100-200ul 复苏菌液涂板，也可先离心后涂板：5000 rpm 离心一分钟收菌，重悬后取 50-100 μl 涂布到含相应抗生素的 2YT 平板上（因菌量较大，若全部涂板请涂两块直径 9cm 平板）。将平板倒置放于 37°C 培养箱过夜培养 15-17 小时。

### ● 抗生素使用浓度：

大部分枯草芽孢杆菌表达质粒（pDG364、pHT43、pHT1469、pHT254【唯地货号：PB1011、PB1021、PB1031、PB1041】等）使用氯霉素进行筛选，WB800N 使用的筛选浓度是 5ug/ml(氯霉素溶液唯地货号：YC9030L)

● 2YT 液体培养基货号：CM1016L；2YT 固体培养基货号：CM1016S。

### ● 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. 加入枯草繁育培养基 2YT 后，孵育时间可调，一般孵育时间越长，转化效率越高。
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）。
4. pHT10 质粒为唯地生物优化后序列，去除一些非必须元件，添加额外的酶切位点，试验者可自行在 MCS 区添加各种适合枯草芽孢杆菌的蛋白表达框（组成型/诱导型），可同时添加 2-3 个独立的蛋白表达框同时表达 2-3 个蛋白。