

WB800N 二代甘油菌种说明书

● 产品规格 (CAT#: Bbs-1030)

WB800N 二代甘油菌	400 μ l / 1 支	保存: -80 $^{\circ}$ 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: nprE aprE cpr bpr mpr::ble nprB::bsr Δ vpr 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 $^{\circ}$ 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 多删除两个蛋白酶，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。

● 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 15-24h，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。

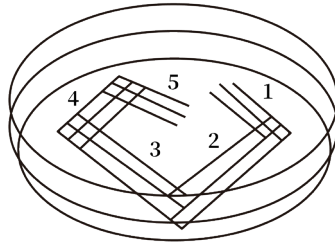


图 1. 五段交叉划线法示意图

● 质粒, 抗生素和培养基:

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, 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。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。
- 2, 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; 扩增后必须做表型、功能验证。