

### BL21(AI)-KJE 产品说明书

#### ● 产品规格 (CAT#: ECC0402)

产品组分	规格	ECC0402S	ECC0402M	保存条件/时间
BL21(AI)-KJE Competent Cell	100µl/支	10 支	50 支	-80°C (6 个月)
pUC19 (control vector, 10pg/µl)	10µl	1 支	1 支	-80°C (36 个月)

#### ● BL21(AI)基因型 $F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm(AI)$ [DnaK DnaJ GrpE Cam<sup>R</sup>]

#### ● 产品说明

BL21(AI)-KJE, 是含有 DnaK、DnaJ、GrpE 三种分子伴侣的 BL21(AI)。DnaK、DnaJ、GrpE 是来自大肠杆菌的伴侣蛋白, 在 18-37°C 表现出较高活性, 在 BL21(AI) 细胞中表达时, 可辅助外源蛋白折叠, 形成正确构象, 减少重组蛋白包涵体的形成, 增加可溶重组蛋白的表达量及生物活性。在培养基中添加 L-阿拉伯糖可诱导 BL21(AI)-KJE 基因组中 araBAD 启动子下游 T7RNA 聚合酶的表达进而促进目的蛋白的表达。在培养基中添加葡萄糖可抑制 araBAD 启动子下游 T7 RNA 聚合酶的表达进而抑制目的蛋白的表达。BL21(AI)-KJE 感受态细胞适用于任何以 T7 启动子为基础的表达载体, 能够进行高水平的重组蛋白表达。因为菌株能够对体内的 T7 RNA 聚合酶水平进行高效调节, BL21(AI)-KJE 感受态细胞能够表达对其他 BL21 细胞有毒性或抑制生长的蛋白。普通重组蛋白在 BL21(AI)-KJE 菌株中获得的产量和其他 BL21 菌株产量相当或更高; 对大部分毒性蛋白, 在 BL21(AI)-KJE 菌株中获得的产量高于其他 BL21 菌株。BL21(AI)-KJE 可同时表达 T7 RNA 聚合酶和大肠杆菌 RNA 聚合酶, 可用于 pET 系列, pGEX, pMAL 等质粒的蛋白表达。BL21(AI)-KJE 感受态细胞由特殊工艺制作, pUC19 质粒 (2686bp, Amp<sup>R</sup>) 检测转化效率  $>1 \times 10^8$  cfu/µg DNA。

#### ● 操作方法

1. 感受态细胞从 -80°C 拿出, 迅速插入冰中, 5 分钟后待菌块融化, 加入目的质粒, 并用手拨打 EP 管底轻轻混匀 (避免用枪吸打), 冰中静置 25 分钟。42°C 水浴热激 45 秒, 迅速放回冰中静置 2 分钟, 晃动会降低转化效率。
2. 向离心管中加入 700 µl 不含抗生素的无菌培养基 (2YT 或 LB), 混匀后 37°C, 200 rpm 复苏 60 分钟。
3. 5000 rpm 离心一分钟收菌, 留取 50µl 左右上清轻轻吹打重悬菌块并涂布到含相应抗生素的 2YT 或 LB 培养基上, 将平板倒置放于 37°C 培养箱过夜培养。

#### ● 抗生素使用方法

抗生素名称	配方	原液	工作液
羧苄青霉素 (carb) (唯地 CAT#: YC9040)	双蒸水溶解, 0.22 µm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	50 µg/ml
硫酸卡那霉素 (kan) (唯地 CAT#: YC9020)	双蒸水溶解, 0.22 µm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	50 µg/ml
氯霉素 (Cam) (唯地 CAT#: YC9030)	无水乙醇溶解, 0.22 µm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	20 µg/ml
庆大霉素 (Gent) (唯地 CAT#: YC9090)	双蒸水溶解, 0.22 µm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	20 µg/ml

BL21(AI)-KJE 感受态含有具有氯霉素抗性的分子伴侣共表达质粒, 转化原核表达质粒时, 需同时在培养基中加入

20ug/ml 的氯霉素和原核表达质粒所带抗性抗生素进行筛选和诱导。

### ● 共表达分子伴侣，诱导目标蛋白操作步骤

阿拉伯糖使用方法：L-阿拉伯糖与 IPTG 一起加入培养基中。L-阿拉伯糖的浓度决定 T7RNA 聚合酶的丰度，L-阿拉伯糖的浓度越高，细胞内 T7RNA 聚合酶越多，目标蛋白 mRNA 的转录越快，蛋白的翻译也越快，有利于提高目标蛋白产量，但同时会增加形成包涵体的概率。若目标蛋白合成正常但可溶蛋白比例偏低，可以考虑降低诱导时营养液中 L-阿拉伯糖的浓度，L-阿拉伯糖浓度的可调节范围为 0.05%-0.5%；若目标蛋白无法诱导或诱导条带偏弱，可以考虑提高诱导时营养液中 L-阿拉伯糖的浓度，诱导不同蛋白的最佳阿拉伯糖浓度需要实验者优化。实验者也可在调高 L-阿拉伯糖浓度的同时提高 IPTG 浓度，在调低 L-阿拉伯糖浓度的同时降低 IPTG 浓度（IPTG 浓度的可调节范围为 0.1-20mM）。

#### 一. BL21(AI)-KJE 感受态诱导目标蛋白方法：

1. 筛选平板长出的菌落，接菌到大于 20ml 的透气试管（加入 2ml 含相应抗生素的 LB）中，37°C，200rpm 小摇 10-16h。
2. 小摇菌液变浓之后，按 1-2% 的比例接菌到大摇瓶中（20ml 以上含相应抗生素的 LB；使用透气三角瓶；营养液的体积最好控制在三角瓶标定体积的 10%-20% 之间），37°C，200rpm 摇菌直到菌液 OD600=0.45-0.65 时，加入终浓度 1mM 的 IPTG，终浓度 0.2% 的 L-阿拉伯糖（唯地 CAT#：C1040）继续培养。
3. 可 37°C 也可低温诱导（若低温诱导，需将菌液埋入冰中静置 1-6min，充分降温到目标温度后再加入 IPTG、L-阿拉伯糖，也可在 0.1-20mM 范围内调整 IPTG 浓度。不同蛋白原核表达的最佳诱导温度，时间，诱导剂浓度需实验者优化。

附言：DnaK、DnaJ、GrpE、分子伴侣来自大肠杆菌，在 18-37 度时活性更高，温度越高活性越高，最适温度为 25-37 度。

#### 二. 自诱导培养基诱导目标蛋白方法：

1. 小摇：参考以上菌株对应抗生素添加抗生素，37°C，200 rpm 过夜摇菌约 10-24h，菌体摇浓，一般要求 OD600>2.0。
2. 按 2-5% 的比例接菌到 AIM-2YT Broth 自诱导培养基中，加入终浓度 0.2% 的 L-阿拉伯糖（唯地 CAT#：C1040）。
  - A. 30-37 度诱导：200-300rpm，摇菌 8-24h；
  - B. 18-25 度诱导：200-300rpm，摇菌 12-48h。
- C. 若所表达蛋白为毒性蛋白，可先在 37 度摇菌，待菌体 OD600=0.8 左右时降温到目标温度开始诱导蛋白表达。
3. 最佳摇菌时间与所表达蛋白有关，为找到最佳诱导时间可在不同诱导时间点取样。

### ● 分子伴侣的大小及检测

1. DnaK：70 kDa 左右，DnaJ：40 kDa 左右，GrpE：20 kDa 左右。
2. 在 SDS-PAGE 凝胶电泳时，大部分情况可以看到共表达的分子伴侣条带，但 20kDa 条带并不清晰；若表达的目标蛋白影响了大肠杆菌的细胞周期和表达谱，分子伴侣表达量会下降，可能看不到相应的分子伴侣条带或条带较弱。

IPTG 溶液 (1M, 过滤除菌), 货号: YC8022	20%阿拉伯糖溶液, 货号: C1040	LB 液体, 货号: CM1010L
高密度 LB 液体培养基, 货号: CM1310L	2YT 液体, 货号: CM1016L	LB 固体, 货号: CM1010S
AIM-LB 自诱导培养基, 货号: AIM1014L	AIM-2YT 自诱导培养基, AIM1016L	TB 液体, 货号: CM1018L

### ● 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，不可在冰中放置时间过长，长时间存放会降低转化效率，混入质粒时应轻柔操作，转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。
2. IPTG 浓度可在 0.1-20 mM 之间优化，阿拉伯糖浓度可在 0.05-0.5% 之间优化，最佳诱导时间，温度需实验者优化。
3. 分子伴侣诱导剂 I (100×) 在 4°C 可稳定保存 12 个月；放 -20°C 可稳定保存 24 个月。