# BL21(AI)Chaperone Chemically Competent Set 产品说明书

## ● 产品规格（CAT#：ECC0401）

| 产品组分 | 货号 | 规格 | 保存条件/时间 |
|---|---|---|---|
| BL21(AI) Competent Cell | EC1004 | 100μl /支，5 支 | -80℃（6 个月） |
| BL21(AI)-Cpn10-Cpn60 Competent Cell | ECC0408 | 100μl /支，5 支 | -80℃（6 个月） |
| BL21(AI)-KJE Competent Cell | ECC0402 | 100μl /支，5 支 | -80℃（6 个月） |
| BL21(AI)-EL-ES Competent Cell | ECC0403 | 100μl /支，5 支 | -80℃（6 个月） |
| BL21(AI)-KJE-EL-ES Competent Cell | ECC0404 | 100μl /支，5 支 | -80℃（6 个月） |
| BL21(AI)-TIG Competent Cell | ECC0405 | 100μl /支，5 支 | -80℃（6 个月） |
| BL21(AI)-EL-ES-TIG Competent Cell | ECC0406 | 100μl /支，5 支 | -80℃（6 个月） |
| BL21(AI)-KJE-EL-ES-TIG Competent Cell | ECC0407 | 100μl /支，5 支 | -80℃（6 个月） |
| pUC19 (control vector, 10pg/μl) | —— | 10μl | -80℃（36 个月） |
| 分子伴侣诱导剂 I（100×） | DR1103-5 | 5ml/支，2 支 | -20℃（12 个月） |

## ● BL21(AI)基因型 $F^-$ *ompT* *hsd*$S_B$($r_B^-$ $m_B^-$) *gal* *dcm*(AI)

## ● 产品说明

本感受态套装由八种感受态组成：包括原始 BL21(AI)，及七种分别转化一种伴侣蛋白组合的 BL21(AI)制成的感受态细胞。E.coli 因其操作简单，经常用于表达各种异源蛋白，但在 E.coli 表达异源蛋白时容易产生包涵体；原核细胞在诱导剂诱导表达时转录和翻译速度较快，翻译出的蛋白来不及折叠成正确的构象，这种错误折叠容易产生暴露的疏水区，进而导致蛋白聚集产生包涵体。通过大量实验筛选出六种大小不同的分子伴侣组合，将这七种分子伴侣组合分别导入 BL21(AI)，与目标蛋白共表达，可帮助目标蛋白形成正确的蛋白构象，增加产生可溶蛋白的比例。

在培养基中添加 L-阿拉伯糖可诱导 BL21(AI)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 T7RNA 聚合酶的表达进而抑制目的蛋白的表达。BL21(AI) 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) 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) 菌株中获得产量和其他 BL21 菌株产量相当；对大部分毒性蛋白，在 BL21(AI) 菌株中获得的产量高于 BL21(AI)菌株。BL21(AI)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)分子伴侣感受态细胞由特殊工艺制作，pUC19 质粒（2686bp，AmpR）检测转化效率>1×$10^8$ cfu/μg DNA。

## ● 抗生素使用方法

本产品套装中 BL21(AI) 感受态不含有抗性质粒和分子伴侣，转化原核表达质粒时，只需在培养基中加入原核表达质粒所带抗性抗生素进行筛选即可；BL21(AI)-Cpn10-Cpn60 感受态含有具有庆大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 的庆大霉素和原核表达质粒所带抗性抗生素进行筛选和诱导；

其余六种分子伴侣感受态均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。

## ● 抗生素配方：

| 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 |

## ● 操作方法

1. 感受态细胞从-80℃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。
2. 42℃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。
3. 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℃，200 rpm 复苏 60 分钟。
4. 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℃培养箱过夜培养。

## ● 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)-Cpn10-Cpn60 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℃，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℃，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℃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：Cpn10、Cpn60 分子伴侣在低温时活性更高，温度越高活性越低，最适温度为 4-12 度，其次 12-25 度。

二．其余 6 种分子伴侣感受态诱导目标蛋白方法：

1. 筛选平板长出的菌落，接菌到 15-25ml 透气试管（加入 2ml 含相应抗生素的 LB）中，37℃，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），同时在 LB 营养液中加入终浓度为 1×的分子伴侣诱导剂 I，37℃，200rpm 摇菌直到菌液 OD600=0.45-0.65 时，加入过滤除菌的 L-阿拉伯糖（唯地 CAT#：C1040）至终浓度为 0.2%，同时加入终浓度 1mM 的 IPTG，继续培养。

3. 可 37℃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），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、EL、ES、TIG 分子伴侣来自大肠杆菌，在 18-37 在高温时活性更高，温度越高活性越高，最适温度为 25-37 度。

三．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℃，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，对 BL21(AI)-Cpn10-Cpn60，不需要添加分子伴侣诱导剂 I；其余 6 种分子伴侣感受态，需添加终浓度为 1×的分子伴侣诱导剂 I，

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. 本产品套装中共含有八种分子伴侣，分别为：Cpn10：10 kDa 左右，Cpn60：60 kDa 左右，DnaK：70 kDa 左右，DnaJ：40 kDa 左右，GrpE：20 kDa 左右，EL：60 kDa 左右，ES：10 kDa 左右，TIG：60 kDa 左右。

2. 这八种分子伴侣在 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 10kDa，20 kDa 并不清晰；若表达的目标蛋白影响了大肠杆菌的细胞周期，分子伴侣表达量会下降，可能看不到相应分子伴侣条带。

| 菌株名称 | 共表达分子伴侣 | 菌株名称 | 共表达分子伴侣 |
|---|---|---|---|
| BL21(AI) | —— | BL21(AI)-Cpn10-Cpn60 | Cpn10，Cpn60 |
| BL21(AI)-KJE | DnaK，DnaJ，GrpE | BL21(AI)-EL-ES | EL，ES |
| BL21(AI)-TIG | TIG | BL21(AI)-KJE-EL-ES | DnaK，DnaJ，GrpE，EL，ES |
| BL21(AI)-EL-ES-TIG | EL，ES，TIG | BL21(AI)-KJE-EL-ES-TIG | DnaK，DnaJ，GrpE，EL，ES，TIG |

## ● 相关产品货号

| | | |
|---|---|---|
| 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×）和 20% L-阿拉伯糖溶液在 4℃可稳定保存 12 个月；放-20℃可稳定保存 24 个月。