

WB800 Electroporation-Competent Cell 产品说明书

● 产品规格和内容

产品信息	货号: BsE1035S	货号: BsE1035M	保存条件/时间
WB800 Electroporation-Competent Cell	100μl/ 5 支	100μl/ 20 支	-80℃ (6 个月)
pP43NMK (control vector, 10 ng/μl)	10μl/ 1 支	10μl/ 1 支	-80℃ (6 个月)

● 基因型: trpC2 nprE aprE epr bpr mpr::ble nprB::bsr Δvpr wprA::hyg

● 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℃振荡即可快速生长，发酵工艺成熟。WB800 菌株是常用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。WB800 的 trpC 基因发生 3 bp 缺失突变，突变后菌株无法自身合成色氨酸（由于编码区缺失了 3 个碱基 ATT，trpC 基因编码的蛋白质在第 110 和 111 位氨基酸位置，由原来的两个异亮氨酸减少为一个异亮氨酸）。WB800 基因组中整合了一个博来霉素抗性基因，一个杀稻瘟素抗性基因，一个潮霉素抗性基因，有博来霉素、杀稻瘟素、潮霉素抗性，同时 WB800 将 WB800 基因组中有氯霉素抗性基因，不可转化氯霉素抗性质粒。唯地生物开发的 WB800 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，pP43NMK 质粒（7683bp）检测转化效率 $>2 \times 10^4$ 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℃保存的 WB800 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℃，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 μ l 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℃ 培养箱过夜培养 15-17 小时。

● 抗生素使用浓度：

1. WB800 具有氯霉素抗性，不适合转化氯霉素抗性的枯草芽孢杆菌质粒。
2. 卡那抗性的枯草芽孢杆菌表达质粒（PMA5、pP43NMK【唯地货号：PB1101、PB1121】等）使用硫酸卡那霉素进行筛选，WB800 使用的筛选浓度是 15ug/ml(卡那霉素溶液唯地货号：YC9020L)。
3. 不同枯草菌株对抗生素的敏感度不同，不同质粒表达抗性基因的强度有差异，若使用新的质粒转化枯草菌株，所用的抗生素浓度需要做梯度试验确定。

● 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. 加入枯草孵育培养基 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 ITPG 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）。