WB800 二代甘油菌种说明书

● 产品规格（CAT#：Bbs-1035）

WB800 二代甘油菌	400μl /1 支	保存：-80℃/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：trpC2 ΔnprE ΔaprE Δepr Δbpr Δmpr::ble ΔnprB::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 基因组中有氯霉素抗性基因，不可转化氯霉素抗性质粒。

● 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。

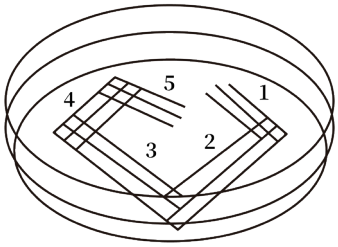


图 1. 五段交叉划线法示意图

● 质粒，抗生素和培养基：

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 50ug/ml(卡那霉素溶液唯地货号：YC9020L)。LB 液体培养基货号：CM1010L；LB 固体培养基货号：CM1010S。

● 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。
2，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；
3，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；扩增后重新保存的菌种必须对菌种做表型、功能验证，所有表型、功能保持完好的菌株才能作为菌种使用。

2nd Lab® For a Better Lab