



# T7 表达感受态细胞

## 产品信息:

组成	BC206-01	BC206-02
T7 Express Competent cells	10×100μl	20×100μl
pUC19 (0.1ng/μl)	5μl	5μl

**储存条件:** -70℃ 保存，避免反复冻融。

## 产品说明:

T7 Express 菌株为大肠杆菌 BL21 增强型菌株，为 Lon 和 OmpT 蛋白酶缺陷型，主要适用于含有 T7 启动子的原核表达载体（如 pET 等）的蛋白表达，同样适用于需要大肠杆菌 RNA 聚合酶来转录 RNA 的非 T7 启动子的表达载体（如 pGEX 等）。该菌株区别于 BL21(DE3)菌株的优势在于 T7 RNA 聚合酶基因整合在细菌染色体上的 lac 操纵子区域，基因组中无λ前噬菌体序列，并具有抗 T1 噬菌体感染等特点。T7 表达感受态细胞经特殊工艺制作，pUC19 质粒检测转化效率大于 10<sup>8</sup> cfu/μg。

## 基因型:

*fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet<sup>S</sup>)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--Tet<sup>S</sup>) endA1 (mcrCmrr)114::IS10*

**菌株抗性:** 对氨苄青霉素，卡那霉素，壮观霉素，氯霉素，链霉素和四环素敏感。

## 质粒转化步骤:

1. 将感受态细胞置于冰水浴中化冻。待细胞刚化冻后，加入质粒 DNA 或 5-10μl 连接产物到细胞中，用手指拨打管底，轻轻混匀；
2. 冰水浴中放置 30 分钟，不要晃动；
3. 42℃ 热击 60 秒钟，不要晃动；
4. 冰水浴中放置 2 分钟，不要晃动；
5. 加入 500μl 无菌的 SOC 或 LB 培养基；
6. 置于 37℃ 摇床中，150-200rpm 震荡复苏培养 60 分钟；
7. 取 50-100μl 菌液涂布在含有抗性的 LB 平板上。待液体吸干后，倒置平板，37℃ 培养 12-16 小时。

**(平板划线分离法:** 复苏培养结束后，12000rpm 离心 30 秒钟，弃掉上清，留 100μl 左右的液体，用 200μl 吸头轻轻吹打散菌块，取 10μl 重悬的菌液分多点滴在平板上，倾斜吸头，用吸头头部的侧面将滴在平板上的液体来回划线。这个方法可以获得更多更大的单克隆菌落。)

**(质粒快速转化步骤:** 将步骤 2 的时间缩短到 5 分钟，对于氨苄青霉素抗性的质粒，步骤 4 完成后，可直接涂布或划线于含氨苄青霉素抗性的 LB 平板上。其它抗性的质粒仍需 60 分钟的复苏培养。)

### 蛋白表达步骤:

1. 挑取单菌落，接种到含 5ml 带抗生素的 LB 培养基中；
2. 37℃，200rpm 震荡培养细菌至对数生长期 ( $OD_{600}=0.4-0.8$ )；
3. 加入 IPTG 到终浓度为 0.4mM，37℃ 诱导 2-4 小时或 16℃ 诱导过夜；
4. 诱导完成后，离心收集菌体，用合适的方法（如考马斯亮蓝染胶法，Western-Blot法或酶活性分析法）分析菌体裂解物的总蛋白、上清和沉淀组分，明确表达产物的表达状况（可溶性或不溶性表达）；
5. 大量表达时，可用 10ml 过夜培养物转接到 1L 培养基中，当培养到  $OD_{600}=0.4-0.8$  时，加入终浓度为 0.4mM 的 IPTG，37℃ 诱导 2-4 小时或 16℃ 诱导过夜（不同蛋白表达的最佳条件有所不同，需在实验中优化）。

BM190306