

枯草芽孢杆菌感受态制备试剂盒

产品编号	产品名称	包装
D0312S	枯草芽孢杆菌感受态制备试剂盒	20次
D0312M	枯草芽孢杆菌感受态制备试剂盒	100次

产品简介:

- 碧云天生产的枯草芽孢杆菌感受态制备试剂盒(*Bacillus Subtilis* Competent Cells Preparation Kit), 也称枯草芽孢杆菌感受态制备及转化试剂盒(*Bacillus Subtilis* Competent Cells Preparation and Transformation Kit), 是一种用于高效制备枯草芽孢杆菌感受态的试剂盒。本试剂盒适用于大多数常见枯草芽孢杆菌如枯草芽孢杆菌168及衍生菌株、WB800等感受态的制备和转化。
- 枯草芽孢杆菌具有吸收细胞外DNA的能力、高效分泌多种蛋白酶以及分解不同的底物来适应多变环境的能力[1]。随着胞外营养物质的匮乏, 生长到稳定期的枯草芽孢杆菌会通过群体感应进入两种不同的发育途径, 形成抗逆性极强的芽孢(80%), 或者形成感受态(20%)来吸取外源DNA作为食物或从中获取新的遗传性状。利用枯草芽孢杆菌的这种特性, 在最低盐培养基中生长一段时间的细胞经过Ca²⁺和Mg²⁺处理, 导致细胞膜的通透性增加, 可有效提高感受态形成率[2, 3]。
- 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是工业应用中一种重要的模式菌株, 具有内毒素低、非致病性、遗传背景清晰、分泌蛋白能力强、容易分离培养等特性, 是异源蛋白表达和分泌的理想宿主, 广泛应用于食品工业、饲料发酵及生物工程等行业。与其它原核表达宿主相比, 枯草芽孢杆菌具有以下优势: 1、非致病性, 是公认的生物安全(Generally regarded as safe, GRAS)菌株; 2、细胞壁组成简单, 内毒素含量较低[4]; 3、单层细胞外膜结构, 具有很强的分泌蛋白能力[5]。
- 针对枯草芽孢杆菌容易分泌蛋白酶降解外源蛋白的问题, 目前已经开发出多种蛋白酶缺陷型菌株, 如WB600、WB700、WB800和168Δ4等, 这些蛋白酶缺陷型菌株都是由常用的模型菌株*Bacillus subtilis* 168改造而来[6]。为了提高蛋白产量, 对枯草芽孢杆菌菌株的改造主要集中在转录和翻译两个方面。在转录水平上, 主要是对启动子进行优化, 如在*Pgrac01*的基础上对启动子的UP element、-35和-15区域进行优化得到了*Pgrac100* [7]; 在翻译水平上, 主要是通过选择合适的核糖体结合位点(RBS)、信号肽和5'-UTR区, 研究表明可通过改变5'-UTR区提高mRNA的稳定性和翻译效率, 从而提高目的蛋白的表达量[8]; 此外, 还可以借助信号肽预测工具为目的蛋白分泌选择合适的信号肽, 将目的蛋白分泌到培养基中, 简化后续纯化的步骤, 从而提高目的蛋白的产量。
- **本试剂盒适用范围广。**本试剂盒适用于大多数常见的枯草芽孢杆菌, 如枯草芽孢杆菌168及衍生菌株和WB800等均可制备感受态, 制备后的感受态可以用于质粒转化和目的蛋白表达。
- **本试剂盒组分齐全、操作简单。**本试剂盒提供了专门用于制备枯草芽孢杆菌感受态的培养液, 使感受态的制备更加简单、便捷。
- 使用碧云天枯草芽孢杆菌感受态制备试剂盒(D0312)制备的枯草芽孢杆菌感受态的转化效果请参考图1。

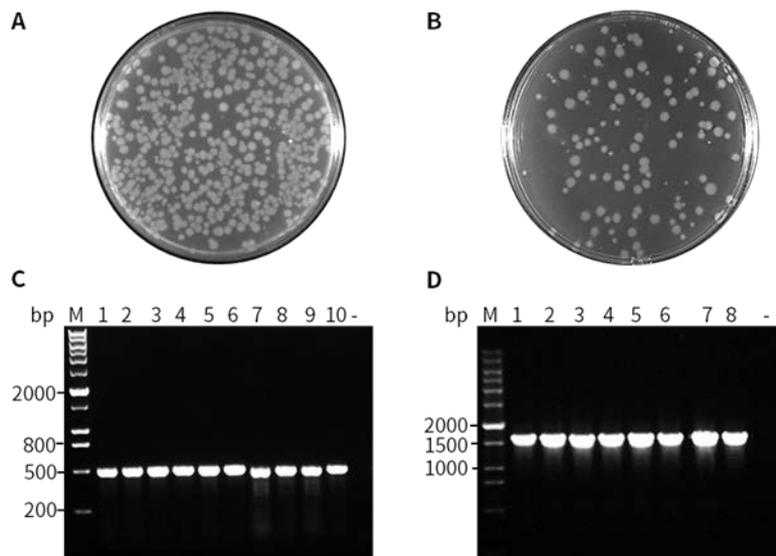


图1. 使用碧云天枯草芽孢杆菌感受态制备试剂盒(D0312)制备的枯草芽孢杆菌感受态的转化效果图。图A. 枯草芽孢杆菌168Δ4甘油菌(D0441) 使用本试剂盒制备的感受态转化1μg *Pgrac100*-N-His-WELQ-Cm质粒(D2523)的效果; 图B. 枯草芽孢杆菌WB800甘油菌(D0442) 使用本试剂盒制备的感受态转化2μg *Pgrac100*-C-His-Tet质粒(D2525)的效果。使用碧云天菌落直接PCR试剂盒(D7280), 从转化的平板上随机挑取单克隆作为实验组(1-10或1-8), 挑取未转化质粒的168Δ4和WB800单菌落作为阴性对照(-), 进行菌落PCR鉴定。图C. 从图A平板挑取菌落进行PCR的电泳结果, PCR扩增引物为5'-GACCTCGTTTCCACCGGAAT-3'和

5'-TCTTCTTCGGTGATTCCTTG-3', PCR产物长度为521bp; 图D. 从图B平板挑取菌落进行PCR的电泳结果, PCR扩增引物为5'-GATTTTCGTGATGCTTGTCAG-3'和5'-CTTCCTCCTTTATATGGGAA-3', PCR产物长度为1570bp。如图C、D所示, 随机挑选的单克隆均为阳性克隆。M: DNA Ladder (0.2-12 kb, 12 bands) (D0110), 图C中"1-10"和图D中"1-8"为实验组, "-"为阴性对照。实际检测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

➤ 本试剂盒可以分多次使用, 小包装和中包装分别足够制备20次和100次感受态, 每次制备的感受态可进行20个转化。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D0312S-1	感受态制备试剂A (10X)	100ml
D0312S-2	感受态制备试剂B	14ml
D0312S-3	感受态制备试剂C	11ml
D0312S-4	感受态制备试剂D	11ml
D0312S-5	感受态制备试剂E	10ml
D0312S-6	感受态制备试剂F	200μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D0312M-1	感受态制备试剂A (10X)	500ml
D0312M-2	感受态制备试剂B	70ml
D0312M-3	感受态制备试剂C	55ml
D0312M-4	感受态制备试剂D	55ml
D0312M-5	感受态制备试剂E	50ml
D0312M-6	感受态制备试剂F	1ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存, 一年有效。4°C保存, 至少一个月内有效。

注意事项:

- 操作时需注意无菌操作, 防止试剂被污染, 影响实验结果, 可在实验中设置空白对照, 排除污染因素。
- 用于制备感受态的菌株必须先进行平板划线活化, 并且不可使用放置超过一周的平板, 否则会降低转化效率。强烈建议使用新鲜培养获得的平板, 以确保获得较高转化效率的感受态。
- 培养基I和II每次使用最好现用现配, 否则也会降低转化效率。
- 本试剂盒中提供的感受态制备试剂A在4°C贮存容易有结晶析出, 属于正常现象, 可以在37°C水浴下充分溶解后使用。
- 本试剂盒中提供的感受态制备试剂D溶液在低温储存如果出现沉淀, 属于正常现象, 可以在室温下充分溶解后使用。
- 本试剂盒仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 试剂的准备。

须自备无菌超纯水、LB液体培养基和LB固体平板; 如果感受态需长期保存, 需自备45% (v/v)的无菌甘油。

2. 菌株活化。

为保证转化效率, 必须先对-80°C保存的枯草芽孢杆菌甘油菌或其它形式保存的菌株进行活化。放置超过一周的平板, 也需要重新活化, 否则制备感受态的效率会大大降低。强烈建议使用新鲜培养获得的平板, 以确保获得较高转化效率的感受态。具体方法: 将菌株划线到对应抗性的LB平板上, 37°C培养过夜。

3. 接种和培养。

取一有新活化菌种的LB平板, 把镊子的顶端在70%酒精中蘸一下, 并在酒精灯上略略烧一下, 使镊子的顶端处于无菌状态。用镊子夹取一个无菌的塑料枪头或牙签, 从平板上挑取一个单克隆, 然后把蘸有菌种的塑料枪头或牙签放到装有3ml对应抗性LB培养基的试管内, 37°C, 200rpm培养过夜, 通常培养时间控制在16-18小时之间。

4. 配制培养基I和II。

次日早上, 按照下表配制培养基I:

名称	成分	体积
培养基I	感受态制备试剂A (10X)	5ml
	感受态制备试剂B	0.625ml
	感受态制备试剂C	0.5ml
	感受态制备试剂D	0.5ml

	无菌超纯水	43.375ml
--	-------	----------

取部分培养基I, 按照下表配制培养基II:

名称	成分	体积
培养基II	感受态制备试剂E	0.4ml
	培养基I	39.6ml

5. 制备枯草芽孢杆菌感受态细胞。

- 取80μl过夜培养的枯草芽孢杆菌菌液, 转接至含4ml培养基I的50ml无菌离心管中, 37°C, 220rpm培养4-5小时至OD₆₀₀介于0.6-0.8。
- 按照菌液: 培养基II=1:9的比例将4ml培养液全部转接至含36ml培养基II的250ml无菌三角瓶中, 37°C, 100rpm培养90分钟。
- 加入8μl感受态制备试剂F, 37°C, 100rpm准确培养10分钟。
- 4°C, 4,000×g离心3分钟收集菌体, 保留4ml上清重悬菌体, 即获得感受态细胞。
- 按照200μl/管分装, 可分装20管。

注1: 如果感受态细胞需要长期保存, 可加入2ml 45% (v/v)无菌甘油, 按照200μl/管分装, 可分装30管。将制备好的含最终浓度15% (v/v)甘油的感受态细胞用液氮速冻后, 转移到-80°C超低温冰箱中, 可以保存3个月以上。

注2: 可根据实际用量对上述感受态制备体积进行放大或缩小。

6. 感受态细胞的转化。

感受态细胞置于冰浴上融化后, 每管加入0.5-5μg质粒, 轻轻混匀, 37°C, 200rpm培养90-120分钟, 4,000×g离心1分钟收集菌体, 留取50μl上清重悬菌体, 涂布对应抗性的LB平板, 37°C培养过夜。如果使用的是冻存的感受态, 需要将感受态置于冰上融化, 再进行转化。

参考文献:

- Kovács ÁT. Trends Microbiol. 2019. 27(8):724-725.
- Shafaati M, Ghorbani M, Mahmoodi M, Ebadi M, Jalalirad R. J Genet Eng Biotechnol. 2022. 20(1):77.
- Xiao J, Peng B, Su Z, Liu A, Hu Y, et al. ACS Synth Biol. 2020. 9(5):1051-1058.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D0312	枯草芽孢杆菌感受态制备试剂盒	20次/200次
D0441	枯草芽孢杆菌168Δ4甘油菌	200μl
D0442	枯草芽孢杆菌WB800甘油菌	200μl
D2521	Pgrac100-C-His-Cm	1μg/100μg
D2522	Pgrac100-amyQ-C-His-Cm	1μg/100μg
D2523	Pgrac100-N-His-WELQ-Cm	1μg/100μg
D2524	Pgrac100-amyQ-N-His-WELQ-Cm	1μg/100μg
D2525	Pgrac100-C-His-Tet	1μg/100μg
D2526	Pgrac100-amyQ-C-His-Tet	1μg/100μg
D7280	菌落直接PCR试剂盒	100次/400次/2000次
ST1150	氯霉素(≥98%, Reagent grade)	5g/25g/100g
ST2753	四环素盐酸盐(≥95%, Reagent grade)	5g/25g/100g

Version 2025.02.06