



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology  
 订货热线: 400-1683301 或 800-8283301  
 订货 e-mail: order@beyotime.com  
 技术咨询: info@beyotime.com  
 网址: http://www.beyotime.com

## 枯草芽孢杆菌WB800甘油菌

产品编号	产品名称	包装
D0442	枯草芽孢杆菌WB800甘油菌	200μl

### 产品简介:

- 碧云天生产的枯草芽孢杆菌WB800甘油菌(*Bacillus subtilis* WB800 Glycerol Stock)是取对数生长期的枯草芽孢杆菌WB800菌液, 加入50% (v/v)甘油使枯草芽孢杆菌处于终浓度为20% (v/v)甘油的培养基环境中制备而成。本甘油菌可以直接平板划线或少量、大量培养。
- 枯草芽孢杆菌是一种无致病性的革兰氏阳性菌, 遗传物质是双链环状DNA, 全基因组有4214810个碱基, G+C含量约43.5%, G、A、C、T分别占24%、30%、20%、26% [1]。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。作为一种模式微生物, 它常用于研究细胞分裂、蛋白质分泌、生物膜发育、次生代谢物产生、细胞外囊泡释放和亲缘分化等[2]。随着基因工程技术的发展, 枯草芽孢杆菌成为了一种重要的外源蛋白表达宿主, 在农业的植物生物防治、重组蛋白生产和食品发酵等领域有着广泛的应用[2]。与其它原核表达宿主相比, 枯草芽孢杆菌具有以下优势: 1、细胞壁组成简单, 内毒素含量较低, 被美国食品药品监督管理局(Food and drug administration, FDA)认定为食品安全菌株(Generally regarded as safe, GRAS)[3, 4]; 2、只有单层细胞外膜, 分泌蛋白能力强[5]。
- 枯草芽孢杆菌在生长培养过程中会分泌很多胞外蛋白酶, 容易造成目的蛋白的降解, 通过基因工程的手段敲除基因组上的胞外蛋白酶基因, 构建如*B. subtilis* WB600、WB700、WB800、WS5等胞外蛋白酶基因缺陷型的菌株, 可极大程度地解决外源蛋白易降解的问题, 有效提高胞外目的蛋白的浓度[6]。
- 枯草芽孢杆菌约有300多个分泌蛋白, 已鉴定的113个分泌蛋白中约有50%携带典型的信号肽序列[7], 为适应环境的变化, 枯草芽孢杆菌进化出多种分泌途径, 主要包括Sec分泌途径、双精氨酸(Two-arginine pathway, Tat)分泌途径和ATP结合转运(ATP-binding Cassette (ABC) transporter)途径等[8]。其中经典蛋白分泌途径是Sec分泌途径, 例如AprE和NprE蛋白酶等都是通过Sec分泌途径分泌至胞外[5]。
- 本产品是在野生型*Bacillus subtilis* 168菌株基础上, 对碱性丝氨酸蛋白酶AprE基因、中性金属蛋白酶NprE和NprB基因、丝氨酸蛋白酶Epr和Vpr基因、芽孢杆菌肽酶Bpr基因、胞外金属蛋白酶Mpr基因、细胞壁蛋白酶WprA基因共8个蛋白酶基因进行敲除而得到的蛋白酶缺陷型菌株[9, 10], 通常使用大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭质粒载体进行蛋白表达, 这种质粒具有两个不同的复制起点, 在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌两个受体菌株中都能进行复制[11]。在质粒上插入多克隆位点和选择性标记基因, 就可以进行外源基因的插入, 再导入相应的宿主菌株完成后续表达。枯草芽孢杆菌感受态制备和转化推荐选购碧云天生产的枯草芽孢杆菌感受态制备试剂盒(D0312)。
- WB800菌株的基因型为: *nprE aprE epr bpr mpr::ble nprB::bsr Δ vpr wprA::hyg*, 含有博来霉素(Bleomycin, ble)、潮霉素(Hygromycin, hyg)、杀稻瘟菌素(Blasticidin, bsr)和氯霉素(Chloramphenicol, cl)抗性基因[12]。
- 本甘油菌适宜的生长温度是30-37°C, 可以使用常规的LB培养基进行培养, 在培养的时候建议加入终浓度为5μg/ml的氯霉素。
- 关于碧云天不同甘油菌菌种的比较和选择, 可参考我们的相关网页: <http://www.beyotime.com/support/strain.htm>

### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D0442	枯草芽孢杆菌WB800甘油菌	200μl
—	说明书	1份

### 保存条件:

-80°C保存, 两年有效, 避免反复冻融。

### 注意事项:

- 使用本甘油菌时可以不必要完全融解, 在甘油菌表面蘸取少量涂板或进行液体培养即可。也可以完全融解后使用, 但随着冻融次数的增加细菌的活力会逐渐下降。在没有结冻的情况下, 菌体会逐渐沉降至管底, 请务必注意适当混匀后使用。
- 为保证菌种纯正, 避免其它细菌污染, 尽量先划平板然后再挑单克隆菌落进行后续无菌操作。
- 本产品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. 划平板接种:

取出甘油菌置于冰上，并置于超净台内，后续操作都在超净台内操作。

- a. **用镊子和塑料枪头操作：**镊子的顶端在75%酒精中蘸一下，并且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200 $\mu$ l塑料枪头，蘸取少量甘油菌，然后把蘸有菌液的塑料枪头，以尽量和LB平板接近平行的角度，在LB平板上连续作S形或Z形划动，再用一无菌的200 $\mu$ l塑料枪头，在原先的划线上以90°或120°角，再在LB平板上连续作S形或Z形划动。通常换枪头重复操作2-3次即可。30-37°C倒置培养过夜。
- b. **用接种环操作：**将接种环在酒精灯上略略烧一下，使接种环处于无菌状态。微冷后，蘸取少量甘油菌，在LB平板上连续作S形或Z形划动。把接种环再烧一下，微冷后，在原先的划线上以90°或120°角，再在LB平板上连续作S形或Z形划动。通常用接种环重复操作2-3次即可。30-37°C倒置培养过夜。

## 2. 直接培养：

取出甘油菌置于冰上，并置于超净台内，后续操作都在超净台内操作。把镊子的顶端在75%酒精中蘸一下，并且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，蘸取甘油菌，然后把蘸有菌液的塑料枪头或牙签放到装有5ml LB的细菌培养试管内。37°C，200rpm培养过夜。

## 参考文献：

1. 张晓舟. 南京农业大学. PhD dissertation. 2006.
2. Kovács ÁT. Trends Microbiol. 2019. 27(8):724-725.
3. Shafaati M, Ghorbani M, Mahmoodi M. J Genet Eng Biotechnol. 2022. 20(1):77.
4. 王杰, 王晨, 杜燕. 微生物学通报. 2021. 48(08):2815-2826.
5. 刘欣. 华南理工大学. PhD dissertation. 2018.
6. 姚动邦. 江南大学. PhD dissertation. 2021.
7. Wang G, Xia Y, Gu Z, Zhang H, Chen YQ, et al. Microb Cell Fact. 2015. 14:179.
8. Song Y, Nikoloff IM, Zhang D. J Microbiol Biotechnol. 2015. 25(7):963-977.
9. Wu SC, Yeung JC, Duan Y, Ye R, Szarka SJ, et al. Appl Environ Microbiol. 2002. 68(7):3261-3269.
10. Tjalsma H, Antelmann H, Jongbloed JD, Braun PG, Darmon E, et al. Microbiol Mol Biol Rev. 2004. 68(2):207-233.
11. 梁晓梅. 天津科技大学. PhD dissertation. 2011.
12. Lim H, Choi SK. Front Microbiol. 2019. 10:1140.

## 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/100次
D0441	枯草芽孢杆菌168 $\Delta$ 4甘油菌	200 $\mu$ l
D0442	枯草芽孢杆菌WB800甘油菌	200 $\mu$ l
D2521	<i>Pgrac100</i> -C-His-Cm	1 $\mu$ g/100 $\mu$ g
D2522	<i>Pgrac100</i> -amyQ-C-His-Cm	1 $\mu$ g/100 $\mu$ g
D2523	<i>Pgrac100</i> -N-His-WELQ-Cm	1 $\mu$ g/100 $\mu$ g
D2524	<i>Pgrac100</i> -amyQ-N-His-WELQ-Cm	1 $\mu$ g/100 $\mu$ g
D2525	<i>Pgrac100</i> -C-His-Tet	1 $\mu$ g/100 $\mu$ g
D2526	<i>Pgrac100</i> -amyQ-C-His-Tet	1 $\mu$ g/100 $\mu$ g

Version 2025.02.06