

## 蛋白表达-破菌操作程序

### 操作程序

#### 1 仪器及试剂

**试剂：** LB 培养基、1\*PBS、IPTG、巯基乙醇（或 DTT）、8M 尿素、3\*SDS 上样缓冲液、12% 分离胶、5%浓缩胶、10%过硫酸铵、TEMED、1\*SDS-PAGE 电泳缓冲液、乙醇、乙酸、考马斯亮蓝（R250）

**仪器：** 灭菌锅、无菌操作台、移液器、恒温摇床、分光光度计、高速离心机、超声波破菌机、电泳槽、电泳仪、脱色摇床、凝胶成像系统

#### 2 诱导：

2.1.取出灭菌的 LB 培养基（300ml）加入对应抗生素，取出 2ml 放入比色皿中，作为标准溶液。

2.2. 将上述已有表达的菌液加入 LB 培养基中，恒温摇床 37 摄氏度 3-4 小时测 OD 值，当 OD 值到达 0.5-0.6 之间时加入 IPTG 诱导（300 $\mu$ l）3-4 小时。

2.3.将菌液倒入离心瓶中离心（3900 转/min 10min）弃上清液。

2.4.需要过夜保存时将离心好的菌液放于-20 度冰柜。

#### 3 破菌：

3.1 取 50ml 的 1 $\times$ PBS，悬浮菌体。加入 50 $\mu$ l 巯基乙醇（还原作用，防止细胞氧化）。

3.2 选择好合适的变幅杆，功率 400W，破菌时间 3S，间隔时间 3S，共 10min，超声破菌（菌液置于冰块中）。离心（9000 转/min）10min 得到上清液①和沉淀，上清①装于 50ml 离心管中，暂时放 4 度保存。

3.3 沉淀先用去离子水小心洗 2 边包括管壁，称取 6g 尿素用 1×PBS 溶解定容到 44ml，倒入沉淀中，吹匀沉淀，倒入 50ml 的烧杯中，功率 400W，破菌时间 3S，间隔时间 3S，共 5min 破菌（菌液置于冰块中），离心（9000 转/min）10min 得到上清液②和包涵体，上清①装于 50ml 离心管中，暂时放 4 度保存。

3.4 沉淀先用去离子水小心洗 2 边包括管壁，包涵体加入 6ml ddH<sub>2</sub>O，悬浮后平均分装到 4 个 2ml 的离心管中，离心（12000 转/min）2min。弃上清。选取其中一管加入 1.5ml 8M 的尿素，溶解、离心（12000 转/min）1min 上清移入到新的 2ml 离心管中。

#### **4 SDS-PAGE 电泳确定蛋白表达位置及纯度：**

将得到的上清液①上清液②包涵体做 10 倍稀释和 50 倍稀释电泳，染色、脱色后确定蛋白表达的位置，上清则需要经过标签纯化，如不在上清，及时处理掉放于 4 度冰箱的上清。如在包涵体且纯度达到要求 90%以上，则将包涵体保存在指定的盒子中，放 -20 度保存。

#### **注意事项：**

1. 诱导时菌体浓度，OD 值范围 0.5-0.6
2. 根据第一次破菌之后沉淀多少决定是否需要第二次破菌
3. 避免连续超声导致大量产热，可分成短时间、多次超声.
4. 如果表达载体的原核启动子为 PL 启动子，则在 30 -32 培养数小时，使培养液的 OD<sub>600</sub> 达 0.4-0.6，迅速使温度升至 42 继续培养 3 -5h；如果表达载体的原核启动子为 tac 等，则 37 °C 培养细菌数小时达到对数生长期后加 IPTG 至终浓度为 1 mmol / L。继续培养 3-5 小时