

蛋白表达试剂配置

(一) 蛋白表达常用培养基

1. 600ml TB 培养基

Tryptone 7.2g, yeast 14.4g, 甘油 3g, 磷酸氢二钾 9.86g, 磷酸二氢钾 1.4g, 去离子水搅拌溶解, 定容至 600ml (可分装成两瓶使用), 其他量依次放大;

2. 100ml LB 液体培养基

Tryptone 1g, yeast 6g, 氯化钠 1g, 去离子水溶解搅拌, 定容至 100ml; 其他量依次放大;

固体 LB 培养基, 按照 1.5%的量加入琼脂

3. 600ml 2xYT 培养基

Tryptone 9.6g, yeast 6g, 氯化钠 3g, 去离子水搅拌溶解后定容至 600ml; 其他量依次放大;

4. 100ml MD 选择培养基

在 80ml 的去离子水中加入 2g 琼脂糖, 120 度灭菌 20min, 温度下降 60°C 之后, 超净台加入 10ml 10xYNB (13.4g/L), 10ml 的 10x 葡萄糖 (20g/L), 0.2ml 的 500x 生物素 (4×10^{-4} g/L);

5. 100ml MM 选择培养基

在 90ml 的去离子水中加入 2g 琼脂糖 (20g/L), 120 度灭菌 20min, 温度下降 60°C 之后, 超净台加入 10ml 10xYNB (13.4g/L), 0.2ml 的 500x 生物素 (4×10^{-4} g/L), 0.5ml 甲醇 (0.5%);

6. 10xYNB

134gYNB 固体溶于 1L 的去离子水中, 过滤灭菌, 4°C 保存;

7. YPD 完全培养基

Tryptone 20g/L, yeast 10g/L, 葡萄糖 20g/L, 固体培养基添加 1.5%的琼脂;

8. RDB 转化培养基

山梨醇 186g/L, 琼脂糖 20g/L, 120 度灭菌 20min, 温度下降 60°C 之后, 超净台加入 10ml 10xYNB (13.4g/L), 10ml 的 10x 葡萄糖 (20g/L), 0.2ml 的 500x 生物素 (4×10^{-4} g/L), 100xAA 1ml, 搅拌混匀, 倒平板 (配置 100ml 灭菌时加入 80ml 水即可);

9. 100xAA (每种氨基酸 0.5%)

准确称取 L-谷氨酸, L-亮氨酸, L-异亮氨酸, L-赖氨酸, L-甲硫氨酸各 500g 溶于 100ml 去离子水中, 过滤灭菌, 4°C 保存;

10. BMGY 诱导表达培养基

Tryptone 20g/L, yeast 10g/L, 磷酸氢二钾 3g/L, 磷酸二氢钾 11.8g/L, 加水至 890ml, 120 度灭菌 20min, 温度下降 60°C之后, 超净台加入 10ml 10xYNB (13.4g/L), 1ml 的 500x 生物素 (4×10^{-4} g/L), 甘油 10ml ;

11. BMMY 诱导表达培养基

Tryptone 20g/L, yeast 10g/L, 磷酸氢二钾 3g/L, 磷酸二氢钾 11.8g/L, 加水至 895ml, 120 度灭菌 20min, 温度下降 60°C之后, 超净台加入 10ml 10xYNB (13.4g/L), 1ml 的 500x 生物素 (4×10^{-4} g/L), 甲醇 5ml ;

12. 500x B (0.02%生物素)

生物素 20mg/100ml 去离子水, 过滤灭菌, 4°C保存 ;

13. 10xBasal Salts 发酵培养基

NH₄H₂PO₄ 50g/L, CaSO₄ 0.93g/L, K₂SO₄ 18.2g/L, MgSO₄·7H₂O 14.9g/L, KOH3g/L, 葡萄糖 50g/L, 磷酸二氢钾 5g/L ;

上述培养基 YNB, 甲醇, 生物素, 氨基酸过滤除菌, 葡萄糖 108°C灭菌 30min, 其余 120°C高压灭菌 20min ;

14. SDS-PAGE 凝胶配置

A 液 : 丙烯酰胺 29.2g, 甲叉双丙烯酰胺 0.8g, 去离子水搅拌溶解, 定容至 100ml ;

B 液 : Tris 18.2g, 加 800ml 去离子水, 调 pH 至 8.8, 加入 4ml 10% SDS, 定容至 100ml ;

C 液 : Tris 6.05g, 加 30ml 的去离子水, 调 pH 至 6.8, 加入 2ml 10% SDS, 定容至 50ml ;

D 液 : 10% SDS

AP : 10%过硫酸铵 : 5g (0.5g) 过硫酸铵, 溶于 50mL (5mL) 去离子水中 ; 现配现用或分装至 0.5mL 离心管中冷冻备用。

TEMED : TEMED (N-N-N`-N` - 四甲基乙二胺) 原液, 低温保存。

不同浓度的 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离胶配置

溶液成分	不同体积的凝胶各成分的体积 (ml)								
6 %	5	10	15	20	25	30	40	50	
水	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5	
30% A 液	1	2	3	4	5	6	8	10	
1.5mol/L Tris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5	
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5	
10% AP	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5	

TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
12%								
水	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
30% A 液	2	4	6	8	10	12	16	20
1.5mol/L Tris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% AP	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15 %								
水	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5
30% A 液	2.5	5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
1.5mol/L Tris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% AP	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

15. 琼脂糖凝胶配置

根据要分离的样品 (DNA) 大小配制合适浓度的琼脂糖凝胶。准确称取一定量的琼脂糖干粉, 加入到合适体积的锥形瓶中, 加入一定量的电泳缓冲液 (30ml 左右 TAE) ; 放入到微波炉内加热融化, 冷却片刻 (不烫手即可) ; 融化后的琼脂溶液摇晃混匀, 倒入电泳槽中, 等其凝固; 室温下凝固 30-40min 左右, 小心的拔出梳子, 取出凝固好的凝胶 4°C 保存;

(二) 常用缓冲液

1. SDS-PAGE 电泳缓冲液

配制 1L, 在 1L 烧杯中准确称取 Tris3.0g, 甘氨酸 14.4g, SDS1.0g, 去离子水搅拌溶解, 定容至 1L;

2. Western blot 转膜缓冲液

配制 1L，在 1L 烧杯中准确称取 Tris 5.8g，甘氨酸 2.9g，SDS 0.37g，甲醇 200ml，加入去离子水搅拌溶解，定容至 1L；

3. SDS-PAGE 上样缓冲液，

① 5xLoading buffer

配制 50ml，在 1L 的烧杯中，准确称取 Tris 0.9g，甘油 32.5g，SDS 5g，DTT 2.75g，溴酚蓝 0.125g，加入适量去离子水搅拌溶解，定容至 50ml；

② 2xLoading buffer

配制 50ml，在 1L 的烧杯中，准确称取 60mM Tris 0.36g，20%甘油 13g，4% SDS 2.0g，150mM DTT 1.10g，0.1%溴酚蓝 0.05g，加入适量去离子水搅拌溶解，定容至 50ml；

4. SDS-PAGE 电泳染色液

R250 (1L)：在合适体积的烧杯中，准确称取 R250 1.0g，甲醇 450ml，乙酸 100ml，充分的溶解。

5. SDS-PAGE 电泳脱色液、

1L：冰乙酸 100ml，甲醇 100ml，充分混匀，室温放置；

6. 1X PBS pH7.4

500ml 1XPBS，在合适体积的烧杯中，准确称取 140mM 氯化钠 4.1g，2.7mM 氯化钾 0.1g，10mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.79g，1.8mM 磷酸二氢钾 0.122g，用 480 左右 ml 去离子水搅拌溶解，调 pH 为 7.4，定容至 500ml；

7. 1xTAE

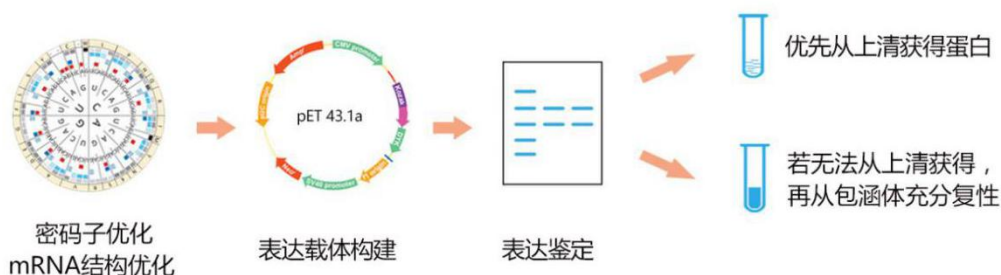
配置 500ml 1XTAE，准备合适体积的烧杯，准确称取 Tris 2.42g，乙酸 0.571ml，EDTA (Na) 0.186g，加入去离子水搅拌溶解，定容至 500ml；

南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

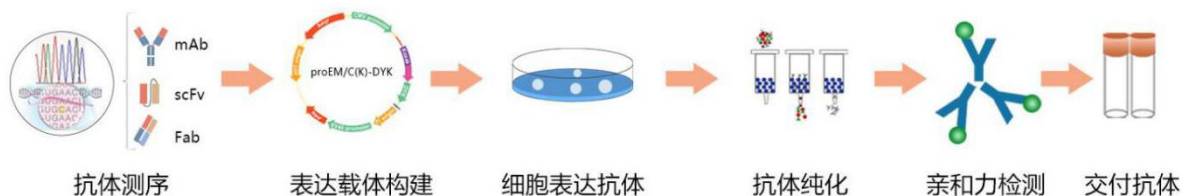
一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



二、蛋白表达（大肠杆菌表达）成功率>95%，不成功不收费，成功有保障



三、重组抗体表达 若想改造一个抗体，可以试试重组表达



四、稳定细胞系构建 研究级细胞系构建 & 高表达细胞株开发

