

大肠杆菌表达实验标准操作流程 (SOP)

实验原理和目的

原理：将外源基因插入质粒或其他载体，再导入活的宿主细胞，使外源基因高效表达，获得所需的蛋白质。大肠杆菌蛋白表达原理及 IPTG 诱导原理详细内容请访问：原核表达 [IPTG 诱导原理](#)。

实验试剂

- 质粒
- 感受态细胞
- TE : 10mM Tris-HCl 1mM EDTA PH=8.0
- LB:试管 4mL ; 固体平板
- 抗性 : A+(100mg/mL) ; K+(50mg/mL) ; CI-
- 保种甘油 : C=80% V=100mL
- IPTG
- 1 x PBS
- 2 x Loading Buffer
- DDH₂O

实验仪器

- 冰箱 (4°C)
- 超低温冰箱 (-80°C)
- 水浴锅 (42°C)
- 摇床 (37°C ; 195r)
- 培养箱 (37°C)
- 可见分光光度计 (OD600 ; OD=0.6-0.8)
- 离心机 (6000r/min)
- 煮样器 (100°C ; 25min)

详细实验步骤

1. 表达鉴定第一天的任务，常用抗性选择根据感受态细胞选择
 - 拿到质粒，离心（3000r/min；2min）
 - 在质粒中加入 TE【使质粒最终加入到 110 μ L 感受态细胞中的量为 80-100ng，据此确定加入 TE 的量】，一般为(1 μ g 质粒加 20 μ L TE；2 μ g 质粒加 50 μ L TE；5 μ g 质粒加 100 μ L TE)
 - 将质粒与 TE 混匀，吸取 2 μ L 混液与感受态细胞混匀
 - 将感受态细胞放入冰箱（4 $^{\circ}$ C）中，30min
 - 取出后立即放入水浴锅中（42 $^{\circ}$ C），热激 90s,
 - 再次放入冰箱（4 $^{\circ}$ C）中，3min
 - 拿出后取 200 μ L 的 LB 液体培养基加入到已转入质粒的感受态细胞中
 - 放入摇床（37 $^{\circ}$ C；195r）中，30min 至 60min；（最佳 45min）
 - 取出离心（3000r/min；2min）
 - 去掉 200 μ L 的上清，留 100 μ L 左右上清悬浮沉淀，吸取 50 μ L 悬液涂平板，【先将对应抗性的平板放入培养箱（37 $^{\circ}$ C）中预热 20min】
 - 把平板放入培养箱（37 $^{\circ}$ C），过夜（12h 至 16h）
2. 表达鉴定第二天的任务，注意 Pcold 表达载体的表达温度
 - 每个平板挑取单菌落至 4 支对应抗性的 LB(4mL) 试管中，编号为“0” “1” “2” “3”
 - 将试管放入摇床（37 $^{\circ}$ C；195r）中，【单抗性 3h 左右；双抗性 4 左右；刚开始用可见分光光度计测 OD 值；熟练后可目测（背光下，以试管中的枪头为例，刚刚看不见枪头即可）】，测 OD 值（0.6 至 0.8）
 - 从“0”号管中取 700 μ L 悬液加入到 100 μ L（C=80%）的保种甘油中，震匀，放入冰箱（-20 $^{\circ}$ C）冻存
 - 在每组菌的“1” “2” “3”号试管中分别加入 2 μ L 的 IPTG【终浓度 0.5mM 最适，可根据日后表达摸索】
 - 视不同的载体选择适合的表达环境【PET/PGEX：15 $^{\circ}$ C表达过夜；25 $^{\circ}$ C表达 6h；37 $^{\circ}$ C表达 3h 至 4h（4 支试管，“0” “1”号试管 15 $^{\circ}$ C表达过夜；“2” “3”试管 37 $^{\circ}$ C表达 3h 至 4h）。Pcold：【全部 15 $^{\circ}$ C表达过夜】
3. 表达鉴定第三天，全菌的表达鉴定分析，注意控制溶质的量及溶液黏度

- 从每组 4 支的试管中均取 500 μ L 菌液加入到 1.5mL 离心管中，【若 OD 值不一样，值小的可多取】离心（6000r/min），5min, 去上清，留沉淀【沉淀少的，可再取菌液离心，尽量使沉淀量接近】
- 在每个离心管中加入 500 μ L 的 DDH₂O, 悬浮沉淀，离心（6000r/min），5min, 去上清，留沉淀
- 在每支离心管中加入 45 μ L 的 1 \times PBS 和 45 μ L 的 2 \times Loading Buffer 悬浮沉淀【当溶质适量且均一的情况下，加入量不变；当溶质多且粘稠时，应使加入量增大，为降低粘度也可减少上液量】
- 放入煮样器（100 $^{\circ}$ C）25min
- 取出后离心（6000r/min）3min, 电泳检测。
- 蛋白表达量不错，进行蛋白纯化；蛋白表达量低或者没表达，可参考[原核表达 FAQ](#) 相对应解决方案解决。

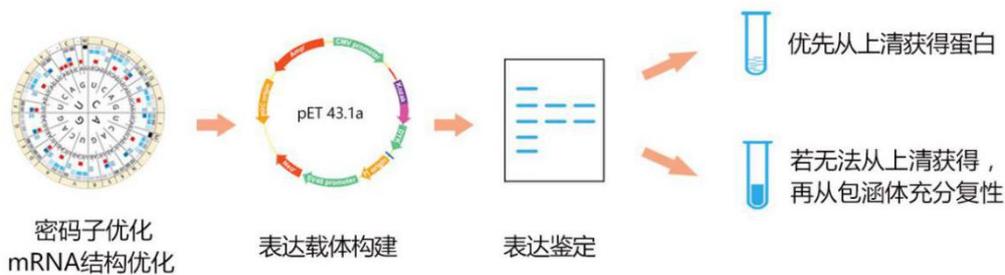
4. 蛋白纯化：见[蛋白纯化](#)专题

南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

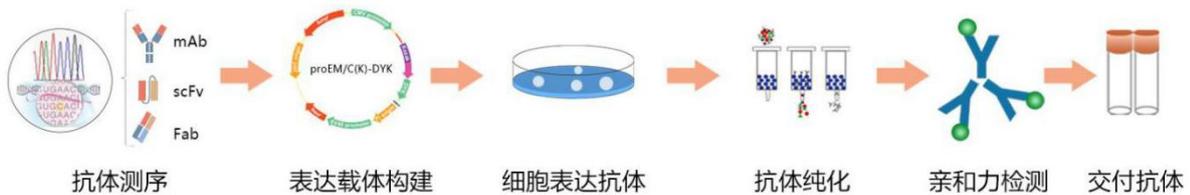
一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



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

