

# 分子生物学：从质粒转化到蛋白提取

简介：此技术的主要目的是得到目标蛋白。通过向细菌中转入带有目标蛋白基因的质粒来让细菌表达目标蛋白。之后通过磁珠法提纯蛋白。

主要步骤：

- 1. 质粒转化：将带有目标蛋白基因，筛选片段以及调节片段的质粒转入细菌体内。
- 2. 细菌培养和筛选：将细菌置于培养基内让其自行扩增，后将扩增完成的细菌置于带有抗生素的培养基内进行筛选。
- 3. 蛋白表达测定：通过电泳的方式来观察目标蛋白是否成功表达
- 4. 蛋白纯化：通过磁珠法将目标蛋白从细菌中分离出来

## 1 药剂配制

液体培养基

药品名称	药品规格	药品用量	药品作用
LB 液体培养基粉末		2.5g	提供必要的营养以及琼脂
去离子水		100ml	

Note：以上是 100ml 配置的用量，具体用量根据比例进行调整

固体培养基（kana）

药品名称	药品规格	药品用量	药品作用
LB 固体培养基粉末		4g	提供必要的营养以及琼脂
去离子水		100ml	
Kana 抗生素	10mg/ml	500μl	筛选细菌

Note：以上是 100ml 配置的用量，具体用量根据比例进行调整。抗生素种类根据质粒类型自行调整，终浓度 50μg/ml.

液体培养基（kana）

Note：所有的培养基必须进行高压灭菌，121℃，15 分钟

药品名称	药品规格	药品用量	药品作用
------	------	------	------

LB 液体培养基粉末		2.5g	提供必要的营养以及琼脂
去离子水		100ml	
Kana 抗生素	10mg/ml	500μl	筛选细菌

Note: 以上是 100ml 配置的用量，具体用量根据比例进行调整。抗生素种类根据质粒类型自行调整，终浓度 50μg/ml.

Note: 所有培养基配置完成后都使用微波炉完全煮沸。等培养基放凉至温热后加入抗生素。培养基温度过高可能会导致抗生素变性。

Tris-HCL buffer

药品名称	药品规格	药品用量	药品作用
Tris	1M	4ml	
NaCl	5M	6ml	
去离子水		90ml	

Note: 以上是 100 ml 的用量，终浓度确保 40mM tris 和 300mM NaCl

Wash buffer

药品名称	药品规格	药品用量	药品作用
Tris-HCL buffer	如上	100ml	
咪唑	粉末	0.33g	

Note: 以上是 100 ml 的用量，终浓度确保 20 mM 咪唑

Elution buffer

药品名称	药品规格	药品用量	药品作用
Tris-HCL buffer	如上	100ml	
咪唑	粉末	4.2g	

Note: 以上是 100 ml 的用量，终浓度确保 250 mM 咪唑

## 2.质粒转化

**Note:** 以下操作要在无菌环境下进行操作

1. 准备解冻好的感受态细菌（Rosetta）和解冻好的质粒（pCU19）

2. 向离心管中加入 50 $\mu$ l 感受态细菌
3. 向离心管中加入 0.5 $\mu$ l 质粒 (16ng/ $\mu$ l)

Note: 质粒总量根据感受态细菌转化效率调整。通常来讲 100 $\mu$ l 细菌 1ng 质粒就够用。但是多加一些没有坏处

4. 冰浴 30 分钟
5. 42 $^{\circ}$ C 水浴锅中热激 60 秒
6. 冰浴 2 分钟

### 3. 细菌扩增

Note: 以下操作要在无菌环境中进行操作

1. 向冰浴完成的细菌中加入 150 $\mu$ l 液体培养基 (无抗生素)
2. 摇床 37  $^{\circ}$ C, 225rpm 复苏 45 分钟
3. 向培养皿中导入 15-25ml 的固体培养基 (kana), 将培养皿的盖子微微打开, 开口朝向酒精灯, 直到固体培养基完全凝固
4. 取 50 $\mu$ l 复苏好的菌液均匀涂抹在固体培养基中

Note: 这一步需要完全涂干, 一般来说如果涂抹的时候有涩的感觉就可以了

5. 37  $^{\circ}$ C 恒温箱倒置培养 16 小时。

6. 将板子上的单克隆菌落挑入 2ml 液体培养基中 (kana), 37  $^{\circ}$ C 225rpm, 16 小时

7. 将 2ml 培养好的菌液按照 1:100 全部接种到液体培养基 (kana) 中, 37  $^{\circ}$ C 225rpm。培育到 OD600 0.6-0.8

Note: 接种到多少毫升的菌液中看需求, 根据比例自行调整。要培养到 OD600 0.6-0.8 通常需要 3-4 小时

8. 取出 1ml 菌液备用。

9. 冰上放置 10 分钟

10. 按照 1iptg :1000 菌液 的比例向菌液中加入 iptg (0.1M), 摇床 37 $^{\circ}$ C 225rpm 培育 3 小时。

### 4. 表达测定

1. 收集培养好的菌液, 将培养好的菌液放入离心管中
2. 离心 5000rpm 5 分钟。去上清留菌

3. 称量细菌质量（先把对应的，没有细菌容器放在秤上，去皮，再称量带有细菌的容器）
  4. 按照 1g 细菌加入 9ml Tris-HCL 缓冲液，重悬
  5. 按照 1 铁锤：9 Tris-HCl 的比例加入铁锤裂菌液
  6. 室温或者冰箱 4℃裂解 10 分钟
  7. 将在步骤 3.8 中取出的菌液离心，5000rpm 5 分钟。去上清留菌加入 20μl 1\*loading buffer。100 °C水煮 15 分钟。离心 13000rpm 10 分钟。作为阴性对照备用
  8. 将裂解好的菌液（步骤 4.6 的结果）离心，4℃，13000rpm 10 分钟。
  9. 将上清转移到新的离心管中，剩下的团块弃置
  10. 取 10μl 上清与 2μl 5\*loading buffer 混合。100℃煮 5 分钟。作为总蛋白样本
- Note：这里可以多准备一到两个样本。之后还会作为对照使用
11. 跑胶（阴性对照和蛋白总样本），每样 10μl。如果出现目标条带，进行接下来的操作

## 5 蛋白纯化

1. 按照每 1ml 菌液上清（步骤 4.9 的产物）加入 400μl 磁珠的比例取出 1.1 倍磁珠。

Note：接下来的用量都是 1ml 上清的用量，这里拿出的是 440μl。用量按比例根据上清量调整。

2. 置于磁力架上，倒掉保存液。
3. 加入等体积的 Tris-HCl buffer，吹匀。再次置于磁力架上
4. 重复步骤 3 两次
5. 最后加入总体积 0.8 倍的 Tris-HCL buffer。
6. 向 1ml 菌液的上清（步骤 4.9 的产物）中加入 400μl 磁珠（步骤 5.5 的产物）
7. 放在冰上 1 小时，不时摇晃
8. 置于磁力架上，取 10μl 上清与 2μl 5\*loading buffer 混合。作为流穿样本。
9. 置于磁力架上，倒掉上清，加入 800μl wash buffer 摇匀，再倒掉。
10. 重复步骤 8 两次
11. 加入 240μl elution buffer。摇匀，至于磁力架上。取出上清，作为 e1 样品
12. 再次加入 240μl elution buffer。摇匀，至于磁力架上。取出上清，作为 e2 样

品

## 6 最终成果检验

1. 各取 e1 和 e2 10 $\mu$ l。与 2 $\mu$ l 5\*loading buffer 混合，作为提纯样本
2. 将总蛋白样本（步骤 4.10 的结果），流穿样本（步骤 5.7 的结果），提纯样本（步骤 6.1 的结果）一起进行跑胶。

Note：理想结果是，总蛋白样本拥有全部条带，流穿样本没有目标条带，e1 和 e2 只有目标条带，e2 拥有更少的杂带。

13. 使用分光光度计测量最总浓度。