**周汇报**

汇报人：汪驰

汇报时间：2019年12月26日星期四

**实验汇报:**

1. **构建表达载体pPIC9k-xx**

后续实验：将基因连接至pPIC9K载体上，以下为带酶切位点的引物的设计表格。采用Prime star酶扩增下述带酶切位点的基因。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 序列分析 | | | |
| 序列名称（大小bp） | 信号肽预测 | 存在9K酶切位点 | 选取的酶切位点 |
| Glu2（2448） | 1-20 | EcoR Ⅰ | Bln Ⅰ、Not Ⅰ |
| Glu3（2391） | 1-18 | EcoR Ⅰ | Bln Ⅰ、Not Ⅰ |
| Glu4（1989） |  | EcoR Ⅰ | Bln Ⅰ、Not Ⅰ |
| Glu5（2586） | 1-19 | Bln Ⅰ、EcoR Ⅰ | SnaB Ⅰ、Not Ⅰ |
| Glu6（2601） | 1-20 | EcoR Ⅰ | SnaB Ⅰ、Bln Ⅰ |
| Rha1（1992） | 1-21 |  | EcoR Ⅰ、Bln Ⅰ |
| Rha2（2376） |  | Bln Ⅰ、EcoR Ⅰ | SnaB Ⅰ、Not Ⅰ |
| Rha3（1836） |  | EcoR Ⅰ | Bln Ⅰ、Not Ⅰ |
| Rha4（1266） | 1-21 |  | EcoR Ⅰ、Bln Ⅰ |
| Rha5（843） |  |  | EcoR Ⅰ、Bln Ⅰ |

表 2 引物序列和酶切位点

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 引物名称 | 序列(5' to 3'） | 酶切位点 |
| G2-F1 | CGCCCTAGGCAGAACTACGGCGGATC | Bln Ⅰ |
| G2-R1 | ATTTGCGGCCGCTTAAGCCGTGACAGGAGTAATCT | Not Ⅰ |
| G3-F1 | CGCCCTAGGGCCCTTGTCTGGGACG | Bln Ⅰ |
| G3-R1 | ATTTGCGGCCGCTCACAGATAGAGCGTCCCG | Not Ⅰ |
| G4-F1 | CGCCCTAGGATGGGTGAGGGGTTCAG | Bln Ⅰ |
| G4-R1 | ATTTGCGGCCGCTCAACTTACCAGCTGAGGAAC | Not Ⅰ |
| G5-F1 | TACGTAAAGGATGATCTCGCGTACT | SnaB Ⅰ |
| G5-R1 | ATTTGCGGCCGCTTACTGGGCCTTAGGCAG | Not Ⅰ |
| G6-F1 | TACGTACACCCCGAGGCG | SnaB Ⅰ |
| G6-R1 | CGCCCTAGGCTACAAAGTAGAACATCCCTCTC | Bln Ⅰ |
| R1-F1 | CCGGAATTCGTGCCTTACAACGAATACATTCT | EcoR Ⅰ |
| R1-R1 | CGCCCTAGGCTATTGACTTGCAACTTCCAAG | Bln Ⅰ |
| R2-F1 | TACGTAATGCCACACAGTAGTCTCA | SnaB Ⅰ |
| R2-R1 | ATTTGCGGCCGCTCAAGGCCATATCACACATT | Not Ⅰ |
| R3-F1 | CGCCCTAGGATGGCCTTAGTGACTAATGTTC | Bln Ⅰ |
| R3-R1 | ATTTGCGGCCGCCTATAGTAAATAGTCAGCAAGCCA | Not Ⅰ |
| R4-F1 | CCGGAATTCGTGCCTTACAACGAATACATTC | EcoR Ⅰ |
| R4-R1 | CGCCCTAGGCTATTTTGGTCCAGTTGGCA | Bln Ⅰ |
| R5-F1 | CCGGAATTCTGGGCAATATCAGCGCC | EcoR Ⅰ |
| R5-R1 | CGCCCTAGGCTATAAGCCCTGCCCCG | Bln Ⅰ |
| G2-F1 | CGCCCTAGGCAGAACTACGGCGGATC | Bln Ⅰ |
| G2-R1 | ATTTGCGGCCGCTTAAGCCGTGACAGGAGTAATCT | Not Ⅰ |

**双酶切反应**

将上述扩增产物与质粒pPIC9K分别进行双酶切，双酶切采用20 µL体系，具体成分如表2-12所示，双酶切条件为：37ºC酶切16 h。回收酶切反应液中的产物，-20ºC储存备用于连接反映。

表3 双酶切反应体系和成分

|  |  |
| --- | --- |
| 目的片段 | 15 µL |
| 10×Buffer | 2 µL |
| 酶1 | 1 µL |
| 酶2 | 1 µL |
| 无菌水 | 1 µL |

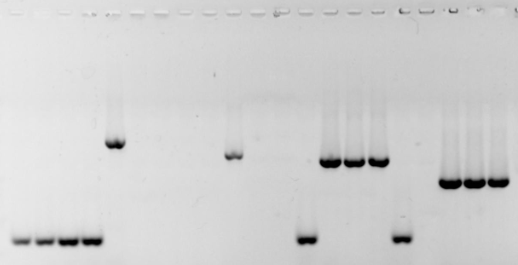
**连接反应**

连接双酶切后的pPIC9K和基因。连接反应采用15µL体系，进行了处理，将载体与目的片段和水加入管中，45摄氏度5min，冰上预冷，以消除重新复性导致的末端相互聚合。体系具体成分如表4所示。连接条件为：16ºC连接18h后即获得表达载体pPIC9K-β-4，转化至DH5α感受态细胞内，筛选出单菌落，菌落PCR验证后，进行测序验证。

表 4 连接反应体系和成分

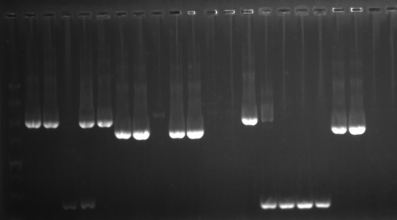
|  |  |
| --- | --- |
| 目的片段 | 6 µL |
| pPIC9K | 3 µL |
| T4连接酶 | 3 µL |
| T4 Buffer | 2 µL |
| 无菌水 | 1 µL |

Result：



**pPIC9K-Rha4**

**pPIC9K-Rha3**



**pPIC9K-Glu4**

**pPIC9K-Rha1**

1. **β-葡萄糖苷酶序列pf-BGL、tm-BGL诱导表达**

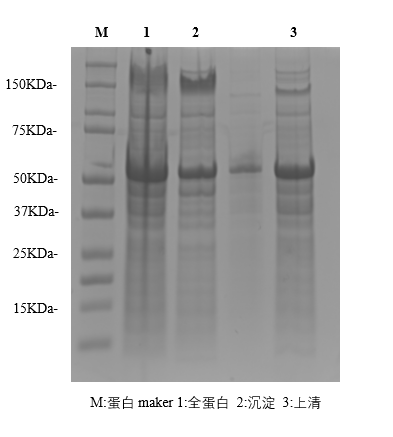
**2.1 合成β-葡萄糖苷酶序列****pf-BGL的常温短时间诱导表达**

**pf-BGL氨基酸序列：**

MKFPKNFMFGYSWSGFQFEMGLPGSEVESDWWVWVHDKENIASGLVSGDLPENGPAYWHLYKQDHDIAEKLGMDCIRGGIEWARIFPKPTFDVKVDVEKDEEGNIISVDVPESTIKELEKIANMEALEHYRKIYSDWKERGKTFILNLYHWPLPLWIHDPIAVRKLGPDRAPAGWLDEKTVVEFVKFAAFVAYHLDDLVDMWSTMNEPNVVYNQGYINLRSGFPPGYLSFEAAEKAKFNLIQAHIGAYDAIKEYSEKSVGVIYAFAWHDPLAEEYKDEVEEIRKKDYEFVTILHSKGKLDWIGVNYYSRLVYGAKDGHLVPLPGYGFMSERGGFAKSGRPASDFGWEMYPEGLENLLKYLNNAYELPMIITENGMADAADRYRPHYLVSHLKAVYNAMKEGADVRGYLHWSLTDNYEWAQGFRMRFGLVYVDFETKKRYLRPSALVFREIATQKEIPEELAHLADLKFVTRK

将菌转接于200 mL LB液体培养基（含Kana 50 μg/mL），37ºC培养至OD600值达0.5–0.6。加入IPTG至终浓度0.5 mmol/L，37ºC常温诱导表达3 h。

下图为诱导后的全蛋白、沉淀、上清的SDS-PAGE



与预测54.6KDa符合

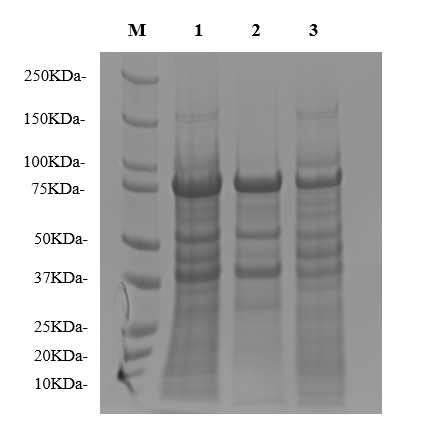
**2.2 合成β-葡萄糖苷酶序列tm-BGL的常温短时间诱导表达**

**pf-BGL氨基酸序列：**

MERIDEILSQLTTEEKVKLVVGVGLPGLFGNPHSRVAGAAGETHPVPRLGIPAFVLADGPAGLRINPTRENDENTYYTTAFPVEIMLASTWNRDLLEEVGKAMGEEVREYGVDVLLAPAMNIHRNPLCGRNFEYYSEDPVLSGEMASAFVKGVQSQGVGACIKHFVANNQETNRMVVDTIVSERALREIYLKGFEIAVKKARPWTVMSAYNKLNGKYCSQNEWLLKKVLREEWGFDGFVMSDWYAGDNPVEQLKAGNDMIMPGKAYQVNTERRDEIEEIMEALKEGKLSEEVLDECVRNILKVLVNAPSFKGYRYSNKPDLESHAEVAYEAGAEGVVLLENNGVLPFDENTHVAVFGTGQIETIKGGTGSGDTHPRYTISILEGIKERNMKFDEELASTYEEYIKKMRETEEYKPRTDSWGTVIKPKLPENFLSEKEIKKAAKKNDVAVVVISRISGEGYDRKPVKGDFYLSDDELELIKTVSKEFHDQGKKVVVLLNIGSPIEVASWRDLVDGILLVWQAGQEMGRIVADVLVGKINPSGKLPTTFPKDYSDVPSWTFPGEPKDNPQRVVYEEDIYVGYRYYDTFGVEPAYEFGYGLSYTKFEYKDLKIAIDGETLRVSYTITNTGDRAGKEVSQVYIKAPKGKIDKPFQELKAFHKTKLLNPGESEEISLEIPLRDLASFDGKEWVVESGEYEVRVGASSRDIRLRDIFLVEGEKRFKP

将菌转接于200 mL LB液体培养基（含Kana 50 μg/mL），37ºC培养至OD600值达0.5–0.6。加入IPTG至终浓度0.5 mmol/L，37ºC常温诱导表达3 h。

下图为诱导后的全蛋白、沉淀、上清的SDS-PAGE

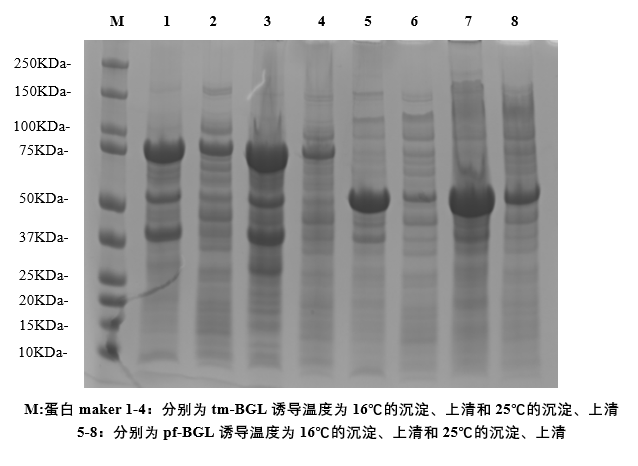


与预测80.1KDa符合

**M：蛋白maker 1：全蛋白 2：沉淀 3：上清**

**2.3β-葡萄糖苷酶序列pf-BGL、tm-BGL的16℃、25℃诱导表达**

将菌转接于200 mL LB液体培养基（含Kana 50 μg/mL），37ºC培养至OD600值达0.5–0.6。加入IPTG至终浓度0.5 mmol/L，16ºC、25ºC温度条件下诱导20h。下图为各个条件下蛋白的SDS-PAGE。



**由此看来蛋白形成了部分可溶性包涵体，后续考虑继续优化诱导条件复性。**