（1）LB液体培养基：称取胰蛋白胨10g、酵母提取物5g、氯化钠10g，双蒸水定容至1 L，分装成若干5mL及200mL培养基，121℃高压蒸汽灭菌20min，备用。

（2）LB固体培养基：称取胰蛋白胨1g、酵母提取物0.5g、氯化钠1g，琼脂粉1.5g，双蒸水定容至100mL，121℃高压蒸汽灭菌20min。待温度降至60℃左右时，加入Amp至终浓度为100μg/mL或者加入Kana至终浓度为50μg/mL。倒入平板待冷却凝固后，封口4℃保存备用。

（3）卡那霉素：使用双蒸水配制浓度为50 mg/mL的卡那霉素溶液， 0.22μm滤器过滤除菌，分装后-20℃冻存。

（4）氨苄青霉素：使用双蒸水配制浓度为100mg/mL的氨苄青霉素溶液，0.22μm滤器过滤除菌，分装后-20℃冻存。

（5）蛋白表达诱导剂IPTG：使用双蒸水配制浓度为1moL/mL的IPTG溶液， 0.22μm滤器过滤除菌，分装后-20℃冻存。

2.2.2 蛋白纯化相关溶液配制

2.2.2.1 融合蛋白EC纯化溶液配制

（1）PB 缓冲液：20 mM Na2HPO4·12H2O，20 mM NaH2PO4·12H2O，pH 7.4

（2）高盐PB缓冲液：20 mM Na2HPO4·12H2O，20 mM NaH2PO4·12H2O， 1 M NaCl，pH 7.4

2.2.2.2融合蛋白LT26纯化溶液配制

（1）平衡缓冲液：20mM Na3PO4，0.5M NaCl，pH 7.4

（2）洗脱缓冲液：①A液：20mM Na3PO4，0.5M NaCl，pH 7.4。②B液：5M咪唑，pH 7.4。用A液将B液稀释成50mM、100 mM、150 mM、200 mM、250 mM、500 mM和750 mM咪唑浓度的洗脱缓冲液。

2.2.2.3 MPT64、Rv2645、Rv3120、Rv1509、LB30和LB43纯化溶液配制

（1）包涵体洗涤缓冲液：100mM Tris-HCl，10mM EDTA，2M尿素，0.5% Triton X-100，pH 8.0

（2）溶解缓冲液：50mM Tris-HCl，150mM NaCl，pH 8.0

（3）变性缓冲液：50mM Tris-HCl，150mM NaCl，8M尿素，pH 8.0

（4）平衡缓冲液：50mM Tris-HCl，50mM NaCl，8M尿素，pH 8.0

（5）洗脱缓冲液：①A液：50mM Tris-HCl，50mM NaCl，8M尿素，pH 8.0。②B液：5M咪唑，pH 8.0。用A液将B液稀释成50mM、100 mM、150 mM、200 mM、250 mM、500 mM和750 mM咪唑浓度的洗脱缓冲液。

2.2.3 SDS-PAGE电泳相关溶液配制

（1）30%丙烯酰胺溶液：称取145 g丙烯酰胺和 5 g N，N’-亚甲双丙烯酰胺（甲叉），用双蒸水定容至 500 mL，4℃避光保存。

（2）1.5 M pH8.8 Tris-HCl溶液：称取18.171 g Tris，加入80 mL 蒸馏水溶解，并调整pH值至8.8，定容至100mL。

（3）1.0 M pH6.8 Tris-HCl溶液：称取12.114 g Tris，加入 80 ml 蒸馏水溶解，并调整pH值至6.8，定容至100mL。

（4）10%过硫酸铵溶液（10%AP） ：称取0.1g过硫酸铵，用双蒸水定容至1mL。

（5）10% 十二烷基硫酸钠溶液（10%SDS）：称取1 g十二烷基硫酸钠，用双蒸水定容至10 mL。

（6）1×Tris-甘氨酸电泳缓冲液：称取14.42 g甘氨酸，3.03 g Tris和1 g SDS，用双蒸水定容至1 L。

（7）蛋白上样缓冲液（5×Loading Buffer）：取 1.0M pH6.8 Tris-HCl 溶液 0.6mL，10%SDS 溶液 2.0mL，1%溴酚蓝 10mL，丙三醇 5.0mL，巯基乙醇 0.5mL，双蒸水定容至 10mL。

（8）考马斯亮蓝G-250染色液：称取0.5 g考马斯亮蓝G-250用双蒸水溶解，再添加50 mL冰醋酸和200 mL甲醇，双蒸水定容至500 mL。

（9）脱色液：100 mL冰乙酸，300 mL甲醇，600mL双蒸水。

（10）分离胶和浓缩胶的制备：首先，安装实验装置使用双蒸水检漏。按表 2-6 体积配制分离胶和浓缩胶，将配置好的分离胶加入组装好的玻璃板中，再用95%乙醇封闭，排出气泡，置于37℃中静置30min。待分离胶完全凝固弃去上层乙醇，添加配置好的浓缩胶，并立即插入电泳梳，室温静置30min后使用。

表2-6 分离胶和浓缩胶的配制

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 成分 | 12%分离胶 | 5%浓缩胶 |
| 双蒸水 | 3.0 mL | 1.4 mL |
| 30%丙烯酰胺 | 6.0 mL | 0.33 mL |
| 1.0 mol/L pH6.8 Tris-HCl | - | 0.25 mL |
| 1.5 mol/L pH8.8 Tris-HCl | 5.7 mL | - |
| 10% SDS | 0.15 mL | 0.02 mL |
| 10%AP | 0.15 mL | 0.02 mL |
| TEMED | 0.006 mL | 0.002 mL |
| 总体积 | 15 mL | 5 mL |

2.2.4 免疫检测相关溶液的配制

（1）PBS 缓冲液：称取 KCl 0.2g，Na2HPO4 1.44g，KH2PO4 0.24g，NaCl 8.0g，双蒸水定容至1L。

（2）DDA溶液：称取50 mg DDA粉末，溶于8 mL无菌PBS中，80℃水浴10min，待DDA溶液变成均匀乳液状后再用PBS定容至10mL，震荡混匀。在无菌环境中配制。

（3）Poly（I:C）溶液：称取10 mg Poly（I:C）粉末，溶于8 mL无菌 PBS中，震荡使其完全溶解，用PBS定容至10 mL，0.22μm滤器过滤除菌。

（4）RPMI 1640基础培养基：用双蒸水将1640粉末溶解，室温搅5h，用0.22 μm的无菌滤器过滤除菌， 4℃冰箱保存备用。

（5）完全培养基：在RPMI 1640基础培养基中添加10%的胎牛血清和1%双抗（青霉素100 U/mL和链霉素100 μg/mL）。