表达过程

1 试剂和耗材

PET30a 空载体（Zoonbio保存）
TOP10 菌株（Zoonbio保种）

Arctic-ExpressTM表达菌（Zoonbio保种）

BL21（Plyss）表达菌（Zoonbio保种）

Rosetta表达菌（Zoonbio保种）

Protein Marker（购自Thermo公司）

IPTG、Acr、Bis、Tris（购自Sigma公司）
SDS（购自Amresco公司）
TEMED（购自BIO-RAD公司）
Tryptone、Yeast Extract（购自 OXOID公司）

0.22 μm无菌滤器和透析袋（购自Millipore公司）
Ni-IDA亲和层析胶（购自Novagen公司）

其它试剂均为国产分析纯

2 主要实验仪器

Allegra 21R台式高速冷冻离心机（美国BECKMAN公司）
台式高速离心机（德国SORVAL公司）
Mini Protean II垂直平板电泳系统、GeL Doc2000成像系统（美国BIO-RAD公司）
320-S pH计（美国MettLer ToLedo公司）
雪花状制冰机（日本SANYO公司）
JY92-2D超声波细胞粉碎机（中国新芝科器研究所）
超净工作台（中国苏净集团）

3实验方法及结果

3.1 重组质粒转化至大肠杆菌Arctic Express 、BL21（DE）3Plyss和Rosetta

1. 将质粒1 μL加入100 μL感受态细菌中，置冰上20 min。
2. 42℃热激90 sec，迅速置冰中5 min，加入600 μL LB培养液。
3. 37℃，220 r/min振摇1 h，离心后全部涂布于含50 μg/mL Amp或Kan的LB平板，37℃倒置培养过夜。

**3.2 IPTG诱导重组表达菌融合蛋白的表达**

1. 挑取转化平板上的单克隆接种于含50 μg/mL Amp或Kan的3 mL LB培养液的试管中，37℃ 220 r/min振摇过夜。
2. 次日按1:100接种于50 μg/mL Amp或Kan的30 mL LB培养液中，37℃ 220 r/min振摇至菌体OD600为0.6-0.8。
3. 取出1 mL培养物，10000 r/min室温离心2 min，弃上清，用100 μL 1×上样缓冲液重悬菌体沉淀。
4. a.向剩余的培养物中加入IPTG至终浓度为0.5 mM， 37℃ 220 r/min振摇4 h，诱导融合蛋白表达。

b.向剩余的培养物中加入IPTG至终浓度为0.5 mM， 11℃ 220 r/min振摇过夜，诱导融合蛋白表达。

1. 取出1 mL培养物，10000 r/min室温离心2 min，弃上清，用100 μL 1×上样缓冲液重悬菌体沉淀。剩余培养物4000 r/min，离心10 min，弃上清，用 PBS重悬菌体沉淀；重悬液进行超声波破碎后，分别取上清液与沉淀液加入上样缓冲液重悬。
2. 进行12% SDS-PAGE检测分析，考马斯亮蓝染色显带。