pET28a 蛋白表达与检测流程总览

从 IPTG 诱导、细胞裂解到 SDS-PAGE 和 Western blot 检测的一体化流程。

1. 过夜培养与扩大培养

LB + Kan + Chlor

20 mL 扩培至 OD600 0.6–0.8

目的：获得适合诱导的对数生长期细胞

2. IPTG 诱导表达

2 μL 1 M IPTG → 终浓度约 0.1 mM

记录中包含 16 °C 过夜组

目的：启动目标蛋白表达

3. 收菌与裂解

4000 rpm, 4 °C, 10 min

600 μL 裂解液 + 冰上超声

目的：破碎细胞并释放蛋白

4. 分离可溶组分

17000 g, 4 °C, 10 min

保留上清（SN）

目的：获得可溶性蛋白样品

5. SDS-PAGE 样品准备

15 μL 样品 + 15 μL 水 + 10 μL 4× buffer

95 °C 5 min，3000 g 1 min

目的：使蛋白变性并准备上样

6. SDS-PAGE 电泳

6 μL ladder；每孔 25 μL 样品

250 V，约 30 min

目的：按分子量分离蛋白

7. 转膜与封闭

Turbo blot 30 min

3% BSA in TBST 封闭 1 h

目的：把蛋白转到膜上并降低背景

8. 一抗 → 洗膜 → 二抗 → 洗膜 → ECL 成像

HIS 一抗 1:5000，4 °C 过夜；二抗 1:50000，室温 2 h

TBST 洗膜 5×5 min，最后 ECL 显影

目的：检测目标蛋白是否成功表达及其分子量位置

关键条件

- IPTG：2 μL 1 M stock / 20 mL
- 低温诱导记录：16 °C 过夜
- 超声：3×5 s, 40% 振幅

理解要点

- 先看表达，再看可溶性
- SDS-PAGE 看条带，Western 看特异性
- 低温诱导常有助于提高可溶蛋白比例