

pET28a 蛋白表达与检测实验协议 (100% 完整校验版)

1. 诱导表达 (Induction)

- **过夜培养:** Make overnight culture of desired strain in LB+ Kan and Chlor. 5 mL culture, 3 replicates (3 herh).
 - 在含有 Kan 和 Chlor 的 LB 中制备目标菌株过夜培养物。5 mL 体系, 3 个重复。
- **接种:** Inoculate 20 ml LB-Kan + chloramphenicol with 200 μ l overnight culture (per sample).
 - 每份样品取 200 μ l 过夜培养物接种到 20 ml LB (Kan+Chlor) 中。
- **生长:** Incubate at 37°C until OD600nm of 0.6-0.8 (0.4 is also fine for toxic proteins). Approx. 3h.
 - 37°C 培养至 OD600nm 达 0.6-0.8 (毒性蛋白 0.4 即可)。约需 3 小时。
- **诱导:** Induction by IPTG of "induced sample" : Induce 3 cultures with 2 μ L of 1M IPTG stock (0.1mM).
 - "诱导组" : 向 3 个培养物中各加入 2 μ L 1M IPTG 储备液 (终浓度 0.1mM) 。
- **诱导表达:** Incubate them at different temperatures: 1x l for overnight at 16°C.
 - 在不同温度下孵育: 诱导样品在 16°C 下过夜培养。

2. 细胞破碎与组分分离 (Fractionation)

- **收获:** Spin down 10 min at 4000rpm, 4°C. Remove supernatant.
 - 4°C, 4000rpm 离心 10 分钟。弃去上清液。
- **重悬:** Resuspend pellet in 600 μ l lysis buffer. (Store at -80°C).
 - 用 600 μ l 裂解液重悬沉淀。(可保存于 -80°C) 。
- **冻融 (取消) :** ~~3x freeze-thaw cycle~~ **TE GEVOELIG ENZYME.**
 - ~~3次冻融循环~~ **酶太敏感, 此步取消。**
- **超声:** Sonication 3x 5sec at 40% amplitude (5 sec intervals) terwijl op ijs.
 - 冰上进行超声: 3 次, 每次 5 秒, 振幅 40% (间隔 5 秒) 。
- **转移:** --> naar epje.
 - 转移至 EP 管中。
- **离心分离:** Spin for 10 min at 17000g op 4°C --> sn bijhouden.
 - 4°C, 17000g 离心 10 分钟。 **保留上清液 (SN)**。

3. 裂解液配方 (Lysis Buffer - 20 mL)

试剂 (Product)	储存浓度 (Stock)	工作浓度 (Work)	20 mL 用量 (Volume/Mass)
Tris-HCl (pH 8)	1000 mM	100 mM	2.00 mL
PMSF	200 mM	0.1 mM	0.01 mL
Water	-	-	17.99 mL
NaCl	MW: 58.44	150 mM	0.18 g
Lysozyme	1 mg/mL	-	0.02 g

4. SDS-PAGE 凝胶电泳 (Step-by-Step)

- **样品稀释:** 30 μ L 总量 --> 15 μ L staal en 15 μ L demi.
 - 30 μ L 体系中包含 15 μ L 样品和 15 μ L 去离子水。
- **加缓冲液:** 10 μ L 4x sample buffer. MENGEN door op en neer pipetteren.
 - 加入 10 μ L 4x 上样缓冲液。通过移液枪吹打混匀。
- **涡旋:** Heel kort vortexen.
 - 非常短暂地涡旋震荡。
- **变性:** 5 min op 95°C ondertussen licht shaken (450).
 - 95°C 加热 5 分钟, 期间保持轻微震荡 (450 rpm)。
- **[!!!] 关键离心: 1 min centrifugeren op 3000g.**
 - **3000g 离心 1 分钟 (去除气泡和沉淀, 这一步必须做) **。
- **准备:** Ondertussen ladder uithalen.
 - 与此同时取出 Ladder (蛋白标准品)。
- **防护:** HANDSCHOENEN.
 - **必须戴手套。**
- **装置:** Gel in tank plaatsen.
 - 将凝胶放入电泳槽。
- **拔梳子:** Kam voorzichtig verticaal omhoog eruit halen.
 - 垂直向上小心拔出梳子。

- **注液:** Tank vullen met running buffer (50mL stock + 450 mL demi water) aan bovenzijde -> loopt over naar het reservoir, vullen tot lijn.
 - 注入电泳液。注满顶部直至溢出到储液槽，加至刻度线。
- **洗孔:** In de welletjes met spuit running buffer spuiten om gel restanten te verwijderen.
 - 用注射器吸取电泳液冲洗加样孔，去除残留凝胶。
- **加标准品:** 6 μ L rainbow.
 - 加入 6 μ L Rainbow Ladder。
- **上样:** Telkens 25 μ L staal in wel pipetteren.
 - 每个孔中依次加入 25 μ L 样品。
- **电泳:** Elektroforese starten. Constant 250 V. 30 min? --> ongeveer.
 - 开始电泳。恒压 250 V。运行约 30 分钟。

5. Western Blot 蛋白质印迹

5.1 转膜 (Bio-Rad Turbo Blot Semi-dry)

- If using pre-assembled transfer packs: Bottom stack -> Membrane (Nitrocellulose) -> Gel -> Top stack.
 - 使用预装包：底部叠层 -> NC 膜 -> 凝胶 -> 顶部叠层。
- Roll out air bubbles and close lid. Insert into turbo blot system.
 - 滚出气泡并盖上盖子。插入转膜系统。
- **If using dry membrane soak in transfer buffer for 1 minute before assembly.**
 - **如果使用干膜，组装前必须在转膜液中浸泡 1 分钟。**
- Run standard programme (30 mins).
 - 运行标准程序 (30 分钟)。

5.2 封闭 (Blocking)

- Insert into little box, and block with blocking buffer (around 20 mL) (3 % BSA in TBST --> 3 g in 100 mL gemaakt).
 - 放入小盒，加入约 20 mL 封闭液 (3% BSA 溶于 TBST) 。
- Incubate on rocker for 1 hour at room temperature.
 - 室温摇床孵育 1 小时。
- **(! Niet spoelen met water) / **(! Do not rinse with water)**.**

- **切记：不要用水冲洗！**

5.3 一抗 (Primary Antibody)

- Pour away blocking buffer and then replace it, see below.
 - 倒掉封闭液，按照下述步骤更换。
- Dilute primary antibody in blocking buffer (4 μ L primary antibody in 20 mL blocking buffer in a falcon first, mix well).
 - 在封闭液中稀释一抗（先在 Falcon 管中将 4 μ L 抗体加入 20 mL 封闭液中混匀）。
- Dilution: 1:5000 for HIS-antibody.
 - HIS 抗体稀释比例为 1:5000。
- Incubate at 4 C overnight on rocker.
 - 4°C 摇床过夜孵育。

5.4 洗涤与二抗

- **Wash 1:** Remove and keep primary antibody (freeze and it can be re-used many times). Wash membrane 5X 5 mins with TBST.
 - **洗涤 1:** 移除并保存一抗（冷冻可多次重复使用）。用 TBST 洗膜 5 次，每次 5 分钟。
- **Secondary Antibody:** Dilute secondary antibody (rabbit) in blocking buffer.
 - **二抗:** 在封闭液中稀释二抗（兔源）。
- Dilution: 1:50000 dilution \rightarrow 0.4 μ L in 20 mL blocking buffer.
 - 稀释比例 1:50,000 \rightarrow 20 mL 封闭液中加入 0.4 μ L。
- Incubate 2 hours at room temperature on rocker.
 - 室温摇床孵育 2 小时。
- **Wash 2:** Wash membrane 5X 5 mins.
 - **洗涤 2:** 洗膜 5 次，每次 5 分钟。

5.5 成像 (Visualize)

- For HRP conjugated secondary antibody, follow instructions with ECL reagents (mix 1:1, pipette onto membrane and image).
 - 使用 ECL 试剂。1:1 混合后滴加到膜上并进行成像。