编 号： 1688

苏州大学基础医学与生物科学学院

实 验 记 录 本

所 在 学 系 病原生物学系

姓 名 徐爱玲

学 号/工 号 20234021008

课题负责人 吴淑燕

领用日期： 2023 年 9 月 18 日

实验名称：细菌 subculture　　2023 年 10 月 14 日

一、实验菌株

10月13日增菌的5种菌：WT、ΔSOPF、PSOPF、Y224D、-7aa

二、subculture（将过夜菌再次活化）

1. 取10支10月11日分装的高盐 LB 培养基试管，标记好（每种菌接2管）。
2. 从过夜培养增菌试管中吸取 30 ul 菌液于高盐 LB 培养基中，放入摇床摇 3h（37°C）。
过夜菌液：高盐培养基 = 1:100（高盐培养基每支试管 3mL）

高渗环境促进细菌Ⅲ型分泌系统（T3SS）分泌。

3. subculture 3h 后用紫外分光光度计测 OD 值。分别测肉汤中的 OD 和洗菌后的 OD 值。
3h 细菌生长处于对数生长期，每种菌多产出同等数量实验测定

4. 洗菌：将 subculture 的细菌移至 1.5mL 离心管，4000 rpm 离心 5min，弃上清。吸取 5mL PBS 吹打混匀，4000 rpm/5min，弃 PBS 上清，重复洗 3 次，弃上清后每管加入 65 mL PBS 混匀，用紫外分光光度计测 OD 值。控制 OD 值在 0.4~0.6

根据生长曲线构造的拟合曲线，在 OD 值介于 0.4~0.6 时，理论值与真实值最接近。

三、实验结果

	肉汤细菌 OD 值（应在 0.9 左右）	PBS 细菌吸光度（OD 值）	excel 计算感染菌量（ul）
WT	1.070	0.589	11.7
ΔSOPF	1.100	0334	17.8
PSOPF	1.183	0384	16.4
Y224D	1.095	0.420	15.4
-7aa	1.160	0.373	16.7

用途：
① 确认细菌是否达到对数生长期；
② 计算菌浓度。

实验名称：RAW264.7 细胞感染　　2023 年 10 月 14 日

一、实验材料

根据用量配制

100 ug/mL 阿米卡星（AMK）抗生素培养液：25mL DMEM + 25 ul 100mg/ml 的阿米卡星储存液（10月11日配）
10 ug/ml AMK 培养液：13.5mL DMEM + 1.5mL 100 ug/mL AMK 培养液
PBS
细胞裂解液（0.3% Triton X-100）：5mL 30% Triton-100 + 500mL 1X PBS 缓冲液

二、实验步骤

1. 10月13日铺板细胞：计数孔计算细胞数，用于计算加菌量。
感染复数（multiplicity of infection，MOI）= 10:1

2. 按 excel 计算的菌量分别加入对应的孔中，轻晃混匀，勿将底层细胞摇起，空的孔用 1mL PBS 补齐，板子置于离心机 1000 rpm/5min，放于 37°C 培养箱，开始计时。

为使加入的细菌沉到底部

细胞与菌同时培养箱，因活菌于净的培养箱。

3. 1h 后换液：弃原培养液，加 1mL PBS 清洗，弃 PBS，清洗 3 次后，每孔加 1mL 100 ug/mL AMK 培养液。用于杀死细胞外的沙门菌

4. 2h 时收取 2h 样品孔（铺板情况见细胞铺板第8步）的蛋白。
将要收蛋白的样品孔置于冰盒上，弃培养液，加 1mL PBS 清洗，清洗 3 次后，吸干净 PBS，每孔加 100 ul 细胞裂解液，用 100 ul 枪头（倒拿）刮取细胞，将全细胞裂解液收集到 1.5mL 离心管中。

5. 3h 时将剩余样品孔换液，弃之前培养液，PBS 清洗 3 次后，每孔加入 10 ug/mL AMK 培养液 1mL。

用于抑制死亡细胞释放出来的沙门菌。

6. 4h 时收取 4h 样品孔的蛋白。
7. 8h 时收取 8h 样品孔的蛋白。
8. 提取全细胞裂解液中的蛋白：
① 离心机 12000 rpm/15min 预冷至 4°C，收取的全细胞裂解液先放于 4°C。
② 收取的全细胞裂解液 12000 rpm/15min，吸取上清（注意不要吸到沉淀），加入到含 20 ul 5X loading buffer 的 1.5mL 离心管中，振荡混匀。
③ 100°C 煮沸 5min，-80°C 存放待用。

一、实验材料

主要试剂：分离胶、浓缩胶（配方如下），无水甲醇，无水乙醇，Running Buffer，Sending Buffer，封闭液（配方如下），BSA，抗体

二、实验步骤

1. 试剂配制：

① 10% 过硫酸铵：过硫酸铵 5g；去离子水 50mL（分装到 1.5mL EP管中，-20℃保存）

② 10% 十二烷基硫酸钠（10% SDS）：SDS 5g；去离子水 50mL（室温保存待用）

③ 5X Loading buffer：SDS 3.2g；DTT 2.488g；溴酚蓝 0.16g；甘油 16mL；1M PH 6.8 Tris-HCl 8mL；去离子水 10mL（定容至40mL，分装后-20℃保存）

④ 1X Running buffer：Tris 3.03g；甘氨酸 14.4g；SDS 1g；去离子水 800mL（定容至1000mL）~~4℃保存~~

⑤ 1X Sending buffer：Tris 3.03g；甘氨酸 14.4g；去离子水 700mL（定容至1000mL）

⑥ 1X TBST 缓冲液：Tris 2.42g；NaCl 8g；去离子水 800mL（定容至1000mL，加入1mL吐温20搅拌混匀）

⑦ 15% 分离胶 15mL：水去离子水 3.4mL；30% 丙烯酰胺 7.5mL；1.5M Tris-HCl 3.8mL（PH=8.8）；10% SDS 0.15mL；15% 过硫酸铵 0.15mL；TEMED 0.012mL

四甲基乙二胺

⑧ 5% 浓缩胶 6mL：去离子水 4.1mL；30% 丙烯酰胺 1.0mL；1M Tris-HCl 0.75mL（PH=6.8）；10% SDS 0.06mL；15% 过硫酸铵 0.06mL；TEMED 0.006mL

⑨ 5% 封闭液：脱脂奶粉 5g；1XTBST 缓冲液 100mL（混匀后4℃保存待用）

⑩ 5% 抗体稀释液：BSA 5g；1XTBST 缓冲液 100mL

2. 装板：按照"厚板朝外，薄板朝内"的原则将玻璃板固定在电泳架上。（用去离子水冲洗干净）

3. 加入适量（7.5mL）分离胶，再缓慢加入无水乙醇，直至两者之间出现一条明显的分界线后，倒掉无水乙醇（30min左右）。随后，加入适量的浓缩胶，待浓缩胶完全凝固后，拔出梳子，不要产生气泡。

4. 电泳（电泳时下方垫抹布，以防漏液）

① 将胶板放置在电泳槽内，加入 1X Running buffer 至刻度线

② 蛋白 Marker 左加 4ul，最右加 2ul，中间孔依次加入样品，每孔 10ul。（为了分清加样方向，方便后续切胶）

③ 电压参数

恒压：浓缩胶 60V；400mA；正向计时，蓝色跑到最底（约1h）

分离胶 110V；400mA；1h

5. 转膜：切除浓缩胶，切除胶底蓝色部分

无水甲醇活化 PVDF 膜，按顺序组装好固定在转印夹上

往电泳槽中加入 1X Sending buffer（事先放冰箱冷藏），~~300~~ 100V；200mA；~~40~~ 35min（恒流）

注意：转膜过程中不要让胶干燥了，泡 Sending buffer，转膜不要有气泡。

6. 封闭：将 PVDF 膜按蛋白大小裁剪后，置于封闭液中 1h。

7. 一抗孵育

LC3 抗体：4.5mL BSA + 4.5 ul LC3 抗体

内参（GADPH）：4.5mL BSA + 4.5 ul GADPH

将封闭后的 PVDF 用 TBST 清洗 2-3 次，转移至一抗孵育液中，室温 30min 后，4℃ 摇床过夜。

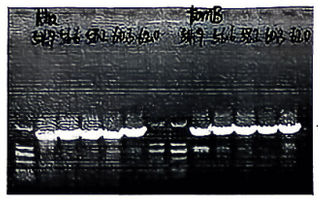
5. 琼脂糖凝胶(0.6%)电泳分离目的片段

0.24g 琼脂糖粉 + 40 mL 1XTAE

110V 35min
120V 15min (35min后未跑完全，加跑15min)

⇒ 后续可用 120V 50min
⇓
此条件最使条带跑出胶外，后续建议 110V 25min，若未跑开可适当延长时间。

退火温度



⇒最亮条带用于凝胶回收

6. 凝胶回收 一天根大量凝胶回收试剂盒

① 在漂洗液PW中加入无水乙醇 (按标签加入 60 mL)。

② 柱平衡：向吸附柱CA3中(吸附柱放入收集管中)加入 500 ul 平衡液 BL，12000 rpm 离心 1min，倒掉收集管中废液，将吸附柱重新放回收集管中。

③ 将单一目的DNA条带从琼脂糖凝胶中切下(尽量切除多余部分)放入干净的离心管中，称重。

	空管(g)	总重(g)	胶重(g)	加溶胶液PN量(ul)
HHA1	0.865	1.043	0.178	178
HHA2	0.84	1.054	0.214	214
HHA3	0.84	0.962	0.122	122
TomB1	0.851	1.046	0.195	195
TomB2	0.829	1.055	0.226	226
TomB3	0.85	0.999	0.149	149

④ 向胶块中加入等体积溶胶胶液PN (如果凝胶重0.1g，其体积可视为 100 ul，则加入 100 ul PN)，50°C 水浴放置，其间不断温和地上下翻转离心管，以确保胶块完全溶解。如果还有未溶的胶块，可继续放置几分钟，直至胶块完全溶解 (若胶块的体积过大，可事先将胶块切成碎块)。

对于回收<300bp的小片段可在加入PN完全溶胶后再加1/2胶体积的异丙醇以提高回收率；胶块完全溶解后将胶溶液温度降至室温再上柱，因为吸附柱在室温时结合DNA的能力较强。

⑤ 将上步所得溶液加入到一个吸附柱CA3中(吸附柱放入收集管中)，室温放置 2min，12000 rpm 离心 30-60sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CA3放入收集管中。

本次实验离心 1min　　容积为 800 ul，若样品体积大于 800 ul 可分批加入。

⑥ 向吸附柱CA3中加入 600 ul 漂洗液PW (使用前检查是否加入无水乙醇)，12000 rpm 离心 30-60 s，倒掉收集管中废液，将吸附柱CA3放入收集管中。本次 1min

如果回收的DNA是用于盐敏感实验，例如平末端连接实验或直接测序，建议 PW 加入后静置 2-5min 再离心。　本次实验静置 3min

⑦ 重复步骤 ⑥。

⑧ 将吸附柱CA3放回收集管中，12000 rpm 离心 2min，尽量除去漂洗液。将吸附柱CA3置于室温放置数分钟，彻底晾干，以防止残留的漂洗液影响下一步的实验。

本次实验放置 5min　　其中的乙醇会影响后续的酶反应(酶切、PCR等)实验。

⑨ 将吸附柱CA3放入一个干净离心管中，向吸附膜中间位置悬空滴加适量洗脱液 ddH2O，室温放置 2min。12000 rpm 离心 2min 收集DNA溶液。　55ul

洗脱体积不应小于 50 ul，体积过少影响回收率。洗脱液的PH对于洗脱效率有很大影响。若后续做测序，需使用 ddH2O 做洗脱液，并保证其PH在 7.0-8.5 范围内，PH值低于7.0会影响洗脱效率；且DNA产物应保存在 -20°C，以防DNA降解。DNA也可以用缓冲液 (10 mM Tris-Cl，PH8.0) 洗脱。为了提高DNA的回收量，可将离心得到的溶液重新加回离心柱中，再次离心。

7. 回收后DNA浓度及纯度检测：

回收得到的DNA片段用 Nanodrop 检测浓度及纯度。

	浓度 (ng/ul)	OD260/OD280
hha1 (4条带合起)	38.2	1.88
hha2 (1条带)	9.5	1.85
tomB1 (4条带合起)	27.7	1.90
tomB2 (1条带)	9.6	1.86

DNA在 OD_{260} 处有显著吸收峰，OD_{260} 为1相当于大约 50 ug/ml 双链DNA、40 ug/ml 单链DNA。OD_{260}/OD_{280} 比值应为 1.7-1.9，如果洗脱时不用洗脱缓冲液，而使用 ddH2O，比值会偏低，因为PH值和离子存在会影响光吸收值，但并不表示纯度低。

回收的带 Kana 抗性的基因片段存于 3419 实验室 -20°C 冰箱 (盒标记：XAL & KL)。

2023.12.24

① 将 12.23 琼脂平板长出的 ZP331 单菌菌落接种到 3mL 含 Strep. Amp 抗性的 LB 培养基中，并加入 30mM L-Arb 诱导 PKD46 质粒中三个重组酶 exo. bet. gam 表达，30°C、220 rpm 摇床过夜。　60ul
阿拉伯糖 (15mmol/mL)

② 将 12.23 复苏的含 PCP20 质粒的菌株传代，37°C 培养过夜。(高压灭菌处理 2023.12.25)

2023.12.25

因实验记录本(游佳怡)号 PCP20 培养温度为 30°C，将 PCP20 重新复苏置于 30°C 培养箱中培养。

后续实验 30°C 培养的和 37°C 培养的同时进行，验证两个温度是否都可以。

实验名称：ZP331感受态制备和Kana抗性基因电转进ZP331感受态　2023 年 12 月 25 日

1. ZP331 感受态

①将 2023.12.24 过夜的 Strep、Amp 抗性的 LB 培养基中的菌液取 250 ul（按1:100的比例接种到 25mL 含 Strep、Amp 抗性的 LB 培养基中，加入 30mM L-Arb（1.5mmol/mL）50 ul 继续诱导三个重组酶的表达，30℃、220rpm 至 OD 为 0.5~0.7（此过程需要4-5h）。

可以用来排除杂菌，因为 ZP331 含 Strep 抗性

此处错误，应加 500 ul

11:58 测 3h OD 值，将电转杯紫外照射 1h（已在 12.24 经 95% 无水乙醇浸泡过夜）

13:58

	OD 值（12:05）3h	OD 值（13:58）5h
空白管	0	0
PKD46 ①-1	0.281	0.917
PKD46 ①-2	0.280	0.873
PKD46 ④-1	0.277	0.827
PKD46 ④-2	0.270	0.864

> 合起 0.828 → 用于后续感受态制备

由于 OD 值超出 0.7，防后续对电转产生影响，于 15:08 重新接菌。

将 2023.12.24 过夜培养的菌液 500 ul 接种到 50mL 含 Strep、Amp 抗性的 LB 培养基中，加入 30 mM L-Arb（1.5mmol/mL）加 100 ul，继续诱导表达三个重组酶，30℃、220rpm 至 OD 为 0.5~0.7。

此处错误，应加 1000 ul。可能是造成后续电转失败的原因，以后重新制备感受态，要确认）

15:08 接菌

18:08 测 3h OD 值	PKD46 ① 0.240	PKD46 ④ 0.204
19:05 测	PKD46 ① 0.427	PKD46 ④ 0.379
19:38 测 4h OD 值	PKD46 ① 0.610	PKD46 ④ 0.552
19:58 测	PKD46 ① 0.658	PKD46 ④ 0.576

⟹ 用于后续感受态制备

②将 OD 值达到标准的菌液立即转移至预冷好的 50mL 离心管中，冰浴 20 min 后（4℃，4000 rpm 离心 15 min）；

高心机提前空转预冷　冰浴同时打开离心机预冷至 4℃

③弃上清，30mL 灭菌水（ddH2O）重悬菌体沉淀，4℃、4000 rpm 离心 15 min（该步骤重复 3 次）。

④弃上清，30mL 10% 甘油（提前配好灭菌冷却备用）重悬菌体沉淀，4℃、4000 rpm 离心 15 min。

⑤弃上清，500 ul 10% 甘油重悬菌体沉淀，每管 50 ul 分装到 1.5mL EP 管中。

冰上操作（制冰）

⑥ -80℃ 储保存（可直接存于 -80℃，无需梯度降温——仅针对本实验）

建议 ZP331 感受态现做现用，不超过 2-3 天，否则转化效率降低（制备好的感受态若转化效率会降低，但半年内可以使用，超过半年需重新制备）。

时间够用你死刑现用我好

结果：制备了 OD 值 0.576、0.658、0.828 的感受态各 10 管存于 -80℃ 冰箱（盒标记：感受态 细菌 XAL&KL）。

2023.12.26　Kana 抗性基因片段电击转化 ZP331 感受态。

将电转杯提前一晚用无水乙醇浸泡过夜，紫外 1h 照射后冰上预冷。

用时打开制冰机制冰

实验名称：　2023 年 12 月 27 日

2023.12.23 回收获得

①将 5 ul Kana 抗性基因片段加入 50 ul ZP331 感受态中，混匀后冰浴 30min。

②将混合液加入预冷的电转杯中，电击转化（2500V、25 uF、200 Ω、2mm）。

加样过程中不能产生气泡，否则会产生火花，电转失效

③电转后立即加入 1mL 预热至 30℃ 的加入 30mM L-Arb 的 LB 培养基。30℃、220rpm 摇 1h 后转移至 37℃、220rpm 摇 2h。

按 6mL 肉汤 + 120 ul L-Arb（1.5mmol/mL）配制

④将摇好的菌液 4000 rpm 离心 5min，倒掉上清，剩余液体与沉淀物吹打混匀涂布在含有 Kana 抗性的琼脂平板上，37℃ 培养过夜（12h 以上）。

可以选择将电转后的产物涂布于含 Amp 抗性的琼脂平板上来鉴定 pKD46 在 37℃ 条件下是否被消除。

结果：

OD=0.658	hha	tomB → 12.27 长出菌落：8个菌，挑4个大的"蛇形"划线
电转时间	5.1 ms	5.0 ms
电转电压	2483 V	2481 V
OD=0.828	hha	tomB
电转时间	5.1 ms	/
电转电压	2482 V	/
OD=0.576	hha → 12.27 长出菌落	tomB
电转时间	5.2 ms	5.2 ms
电转电压	2483 V	2482 V

hha 的菌，全部"蛇形"划线

2023.12.25 复苏的 pCP20（培养在 30℃）挑取单菌落接种到 6mL 含 Amp 抗性的 LB 培养基中，37℃、220 rpm 摇床过夜（带有 pCP20 质粒的菌株为 DH-5α，故不加 Strep）。

2023.12.27 pCP20 质粒小提

①用质粒小提试剂盒（天根）提取 12.26 摇床过夜的含 pCP20 菌液中的 pCP20 质粒。

②详细步骤同 P1 页"pZP2778 质粒提取"。

③ -20℃ 保存质粒。

质粒浓度		OD 值	OD_{260}/OD_{280}		OD 值	OD_{260}/OD_{280}
37℃ 培养	pCP20 ①	488 ng/ul	2.04	30℃ 培养 pCP20 ①	683 ng/ul	2.07
	pCP20 ②	483 ng/ul	1.94	pCP20 ②	644 ng/ul	2.07

此次实验不能说明 37℃ 培养的质粒浓度比 30℃ 培养的低，因为 37℃ 和 30℃ 培养物是 2 位实验人员分别操作，不能排除人为因素。37℃ 培养试管浑浊度比 30℃ 培养的高，但为避免质粒损耗，本实验未进行菌量测定。从之前实验经验，建议直接 30℃ 培养，后续也可去门比较 30℃ 与 37℃ 对实验的影响，但这不是本次实验的目的。制备 hha 与 tomB 敲除株

实验名称：SL1344 - Δhha (ΔtomB)::Kana 菌株纯化与鉴定　　2024 年 1 月 3 日

① 将 1.1 冻存的菌"蛇形"划线，并进行 PCR 验证，具体步骤见 P28页。

② 此次 PCR 反应程序：

预变性	95°C	3min
变性	95°C	15S
退火	54.5°C	15S
延伸	72°C	1.5min
彻底延伸	72°C	5min
	4°C	∞

（变性/退火/延伸 ×35 cycles）

③ 电泳：110V 25 min

实验结果：

野生株 hha 和 tomB 条带长度正确，电转菌株条带长度错误。→电转失败

由于2次电转失败，且电转后的菌株能在 Kana 平板上生长，怀疑 ZP331 菌有污染或变异（几乎不会发生），将 ZP331 单菌落置于含 Kana 和 Strep 肉汤培养基中培养，第二天未见菌生长（肉汤清亮），菌株问题暂且排除。→以防万一 仍复苏了一株新的 ZP331 用于后续感受态制备。

⇓

排除菌株问题后怀疑感受态细胞（细菌的）存在问题，查看游佳临实验记录发现 50mL LB 中应加入 1mL 的 L-Arabinose，所以在 2024.1.6 重新制备感受态和电转。

2024.1.6

研究目的：制备 ZP331 感受态（含 PKD46 质粒的 SL1344）。

实验方法：

① 1.5 晚 18:30 接菌。从 Amp 平板上挑取一个 SL1344-PKD46（ZP331）单菌接入 3mL Amp LB 中，30°C 220 rpm 过夜培养。

② 1.6 早 9:03 subculture。在 50 mL（含Amp）LB 中加入（1 mL）L-Arabinose，将 500 ul 过夜培养的菌液加入 50 mL Amp + L-Arabinose LB 中，30°C 220rpm 培养。

12:00 OD（3h 42min）13:15 OD（4h 12min）13:45 OD（4h 42min）14:05 OD（5h 2min）

新1	0.300	0.438	0.544	0.579
新2	0.340	0.466	0.617	0.696
旧1	0.307	0.457	0.514	0.548
旧2	0.338	0.516	0.639	0.728

（0.5~0.7 → 用于后续电转）

③ 将达到 OD 值的 50 ml 离心管冰浴 20min，同时开启离心机预冷至 4°C。

④ 4000 rpm 15min，弃上清。

实验名称：　　2024 年 1 月 6 日

⑤ 用冰的 ddH2O（30mL）重悬细菌，4000 rpm 15min，弃上清，重复 3 次。

⑥ 用冰的 10% 甘油（30mL，需提前高压灭菌）重悬细菌，4000 rpm 15min，弃上清。

⑦ 用 500 ul 10% 甘油重悬细菌，每管 50 ul 分装至 1.5ml EP 管中。（本次共制备 40 管感受态细菌）

⑧ 保存于 -80°C 冰箱，避免反复冻融。制备的感受态可用半年。

（⑤⑥⑦ 冰上进行）

研究目的：Kana 片段电击转化进感受态。

实验步骤：

（冰上进行（需制冰和冰盒））

① 电转杯前一晚 75% 乙醇浸泡过夜，紫外照射 1h，冰上预冷。

② 5 ul Kana 凝胶回收片段（2023.12.31 回收）加入到 50 ul 的感受态中，轻轻吹打混匀后冰上静置 30min（也可不静置，此次实验静置 5min）。

③ 将混合物加入到电转杯中，贴电转杯反应区的壁加入，不要产生气泡（气泡会在电转过程中产生电火花，使电转失败）。将电转杯放入电转仪电转（电转杯表面必须擦干）。电压 2500V，电容 25uF，电阻 200 Ω，电转杯 2mm。电转杯放入电转仪前也可先冰上静置 10min。

④ 电转后立即加入预热的 30°C 含 L-Arabinose 的 LB 1ml。（L-Arabinose 终浓度为 30 mM）

也可以是含 Amp 的 LB

6ml + 120 ul 1.5 mmol/ml L-Arabinose

⑤ 将菌液转移至 1.5ml 灭菌的 EP 管。30°C 220rpm 培养 1h，37°C 220rpm 培养 2h。

⑥ 培养物 4000 rpm 离心 5min，留 100 ul 左右上清液重悬菌沉淀，涂布于 Kana 平板上，37°C 培养过夜（约 21:00 放入培养箱）。

实验结果：

电转参数	OD=0.696 时	时间	电压	OD=0.548 时	时间	电压
	hha	5.0ms	2481V	hha	5.2ms	2482V
	tomB	5.1ms	2482V	tomB	5.2ms	2482V
	hha+tomB	5.2ms	2483V	hha+tomB	5.2ms	2482V

1.5 mmol/ml L-Arabinose 配制（过滤除菌）：2.251959 L-Arabinose（分子量 150.1）+ 10 ml 去离子水

5.03959 L-Arabinose + 20 ml 去离子水

24h 未见菌落生长，重新制备感受态和质粒回收。

⇓

2024.1.7 重新接菌制备感受态。

① 此次将 ZP331 单菌接入不加 L-Arabinose 的 3mL 含 Amp 的 LB 中，30°C 220 rpm 过夜培养。

② 1.8 早 10:55 subculture。在其中 2 个（锥形瓶）含 Amp 和的 LB 中加入 1mL L-Arabinose，另外 2 个锥形瓶 2h 后（12:55）加入 1ml L-Arabinose。

怀疑 50ml 离心管太密闭效果不好，用锥形瓶 subaulture

有文献表明在 OD 值达到 0.2 左右时加入 IPTG 或阿拉伯糖诱导效果好。