郑雨梦

实验记录本-3

生命科学学院

2026.6 —

郑雨梦
2025425 7014

(3)



260907

pPH-His hTPI1 (1-249) 收菌、收pro.

1、离心 10 min, 4000 rpm, lysis 重悬至 40ml (lysis Buffer = 50mM Tris 8.0, 200mM NaCl)

加 400ul PMSF, 40ul DNase, 100ul lysozyme, MgCl2.

45% 超声 3s+7s, 10 min x2, 取 T. I. 20ul + 20ul 2x SDS loading butter

离心 50 min, 取 S 20ul + 20ul 2x

2、过 Ni 柱 (串联2根)

Ft, lysis, W1, W2, E

~~5x~~ ×3 ×3 ↓

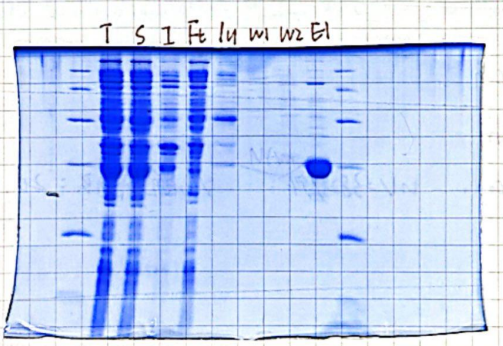
55ml

注: W1 = 50 mM Tris 8.0, 500 mM NaCl

W2 = 50 mM Tris 8.0, 20 mM 咪唑

E = 50 mM Tris 8.0, 250 mM 咪唑.

3、SDS-PAGE. (3ul T. S. I. Ft, 12ul ly、W1、W2、E1).



pro量多、较纯.

离子/分子筛进一步纯化以期获得更好的pro.

4. 离IN1

AKTA C. 150-2

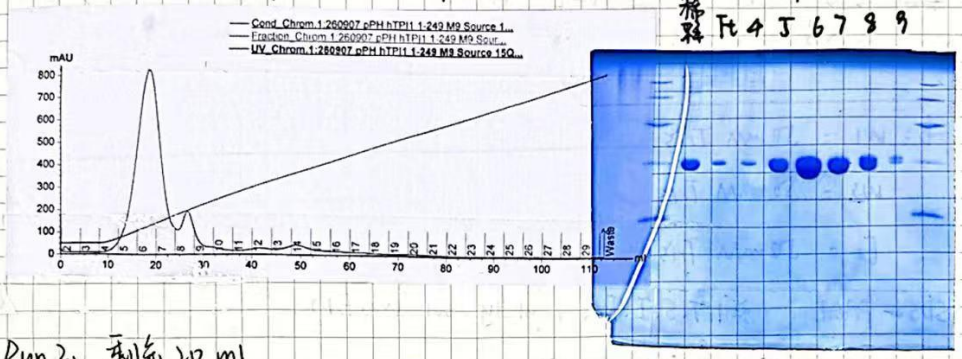
55 ml $\xrightarrow{+QA}$ 110 ml . 20CV洗脱

Run1. 上样电导= 3.75 ms/cm UV= 40 mAU+ 停. (剩20ml)

出峰电导= 3.32 ms/cm

峰尖电导= 7.04 ms/cm UV= 835.023 mAU. 洗脱体积= 18.59 ml

跑胶: 稀释样, Ft, 4-9管 20ul+20ul 2x, 上样 4ul



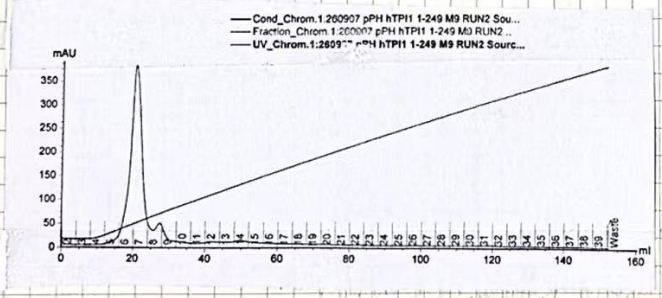
稀释 Ft 4 5 6 7 8 9

Run 2. 剩余20 ml

上样电导= 3.76 ms/cm

出峰电导= 3.42 ms/cm

峰尖电导= 8.03 ms/cm. UV=382.794 mAU 洗脱体积= 20.43 ml



5. 过分子筛

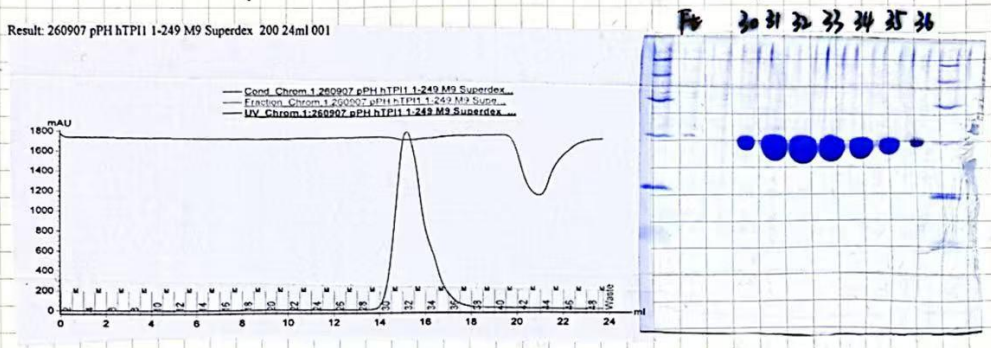
AKTA A , SD200-2

SD buffer: 10 mM Tris 8.0 , 150 mM NaCl , 1 mM DTT

Run 1 5-7
Run 2 6-7
> 20 ml $\xrightarrow[\text{浓缩管}]{0.2\mu m,\ 10\,kd\text{膜}}$ 1 ml , 离心 10 min

峰头 1776.531 mAU . 15.18 mL.
(321)

起胶 Ft, 液压 . 30-36 管 20ul + 20ul 2x , 上样 2ul



性质稳定, pH最多且低
可用于 NMR

6. 浓缩

取 30-36 管 (3.5 ml) $\xrightarrow[\text{浓缩管}]{10\,kd,\ 3000\,g}$ 1.5 ml

测定蛋白浓度为 200 μM , 出分装为 60 ul / 管.

2b1020

二. pBG102 His-SUMO ORP5 1-319, pPGH TrxA-GST ORP8 1-346 C端截短.

此前 pETDuet与 pBG102 共转后跟自表达较单独 pETDuet好，在进行 pETDuet与 pBG102 共转的同时，考虑采用最初的 pBG102、pPGH 的共转.

1. 模板稀释.

pBG102 His-SUMO ORP5 1-319 103 ng/ul 1.9ul + 18.1 ul ddH2O
pPGH TrxA-GST ORP8 1-346-3 194 ng/ul 1ul + 19ul ddH2O
> 10 ng/ul

2. 引物设计.

引物名称	序列(5'-3')	Base
pBG102-ORP5M314-F	GAAAGCGATTGAGAAACCCAGGATCATTGAGATCCGGCTGC	41
pBG102-ORP5M314-R	TGGGTTTCTCAATCGCTTTCTTCCGGGTTTTCGCGTTCG	39
pPGH-ORP8M341-F	GAACATGATTGATCTGATAATGAGGTGTGAAGCTTGCG	38
PPGH-ORP8M341-R	TTATCAGATCAATCATGTTCTTGATCATTTTCTTTATCAG	40

注：使用 2b09.4 ORP5-M309 F/R、ORP8 M336 F/R 引物

pPGH TrxA-GST ORP8 1-346 6265 bp
pBG102 His-SUMO ORP5 1-319 6663 bp.

3. PCR 体系

上游引物	2ul	
下游引物	2ul	
稀释后模板	1ul	
2x Phanta Ultra	15ul	(5-10s/kb).
ddH2O	10ul	

4. PCR程序

预变性	95°C	3 min	
高温	95°C	15s	28x
退火	55°C	15s	28x
延伸	72°C	1 min 8 s	28x
终延伸	72°C	10 min	
	12°C	10 min	
	4°C	∞	

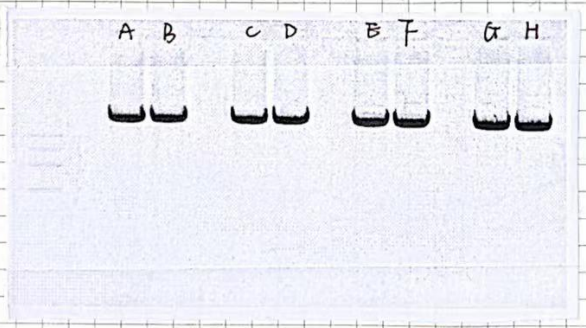
5. 消化

1 ul DPNI, 23 ul CutSmart, 37°C, 3h

6. 琼脂糖凝胶电泳.

上样 30 ul, 150V, 30min.

上样顺序 = AB、pBG102 His-SUMO ORF5 1-309 / CD、pBG102 His-SUMO ORF5 1-314、EF、pGH TrxA-GST ORF8 1-336 / GH、pGH TrxA-GST ORF8 1-341



注: AB、CD、EF、GH 合并后回收.

切胶

7. 胶回收 (50ul)

① pBG102 His-SUMO orf5 1-309　　72.15 ng/ul

② pBG102 His-SUMO orf5 1-314　　88.7 ng/ul

③ pPGH TrxA-GST orf8 1-336　　98 ng/ul

④ pPGH TrxA-GST orf8 1-341　　98.5 ng/ul.

8. 重组 (6ul)

线性化载体　2ul

ddH₂O　1ul

2×CE Mix　3ul

PCR仪 50°C, 15min, 结束后立即置于冰上.

9. 转化.

(1) BL21 4支. 加入 6ul 重组体系, 冰上静置 30min

(2) 42°C 热击 90s, 冰上冷却 5min

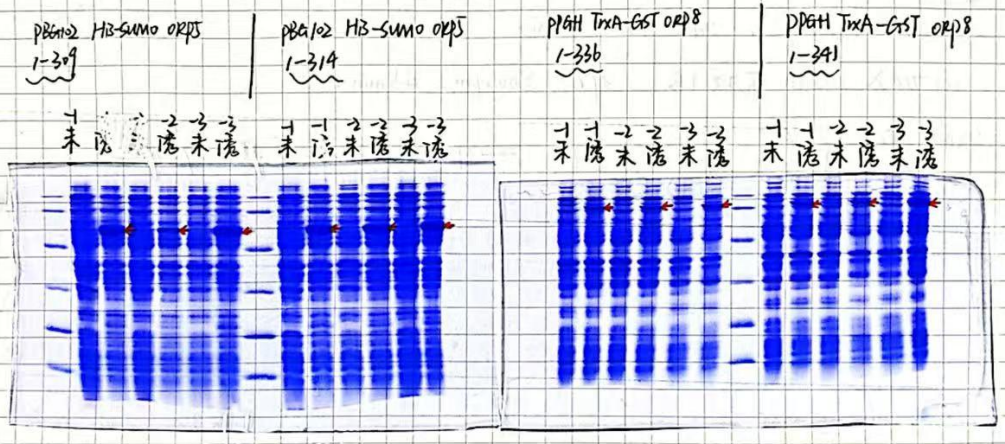
(3) 加入 200 ul 无抗 LB, 37°C, 200 rpm, 45min+

(4) 吸至 { A+ pPGH / K+ pBG102 }, 37°C, ~~200rpm~~ 过夜培养, 19:30 - 9:00

2b1021

一、 pBG102 His-SUMO ORP5 1-309
(K+) pBG102 His-SUMO ORP5 1-314
(A+) pPGH TrxA-GST ORP8 1-336
(A+) pPGH TrxA-GST ORP8 1-341
} 测表达 + 测序

1. 100 ml LB 内加入 100 ul A+ / K+ , 摇匀
2. 取 1 ml 至 5 ml 印管
3. 菌板各挑 3 个单菌落, 37℃, 200 rpm. 3.5h
4. 取 300 ul 菌液至新的 2 ml 印管 } 37°C, 200 rpm, 3h.
   另取 300 ul 加 1.5 ul 0.1 M IPTG
5. 剩余菌液继续培养 3h.
6. 4中样品 13000 rpm, 10 min, 弃上清. 加 50 ul dd H_2O 重悬, 取样 20 ul + 20 ul 2x 95°C 金属浴 10 min, SDS-PAGE 上样 5 ul



7. 5中样品取 200 ul 送测. 取 100 ul 加至 5 ml LB 过夜培养. 19:00 - 9:00 4°C 保存.