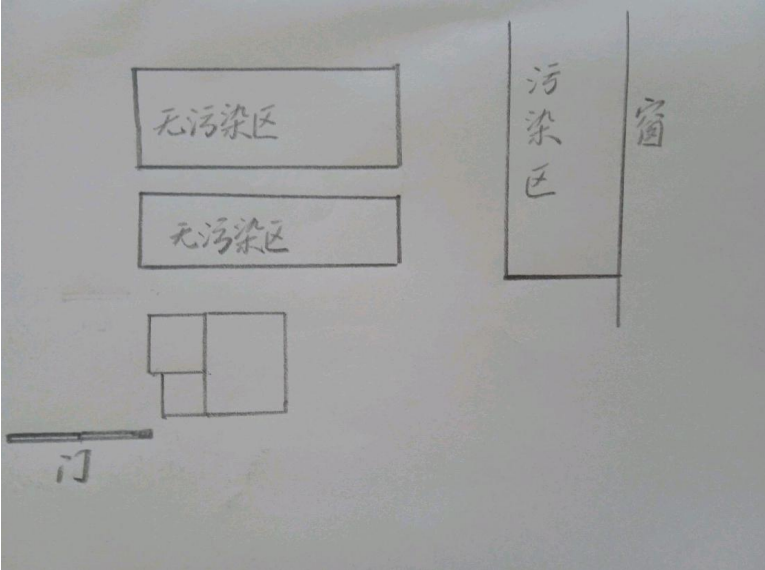


# 2025OUC\_DE湿实验记录

排班参考：<https://docs.qq.com/sheet/DQUhoVHNvRWpNTVRy?tab=BB08J2>

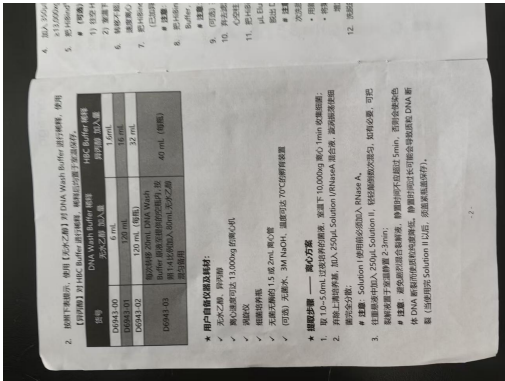
## 实验注意事项

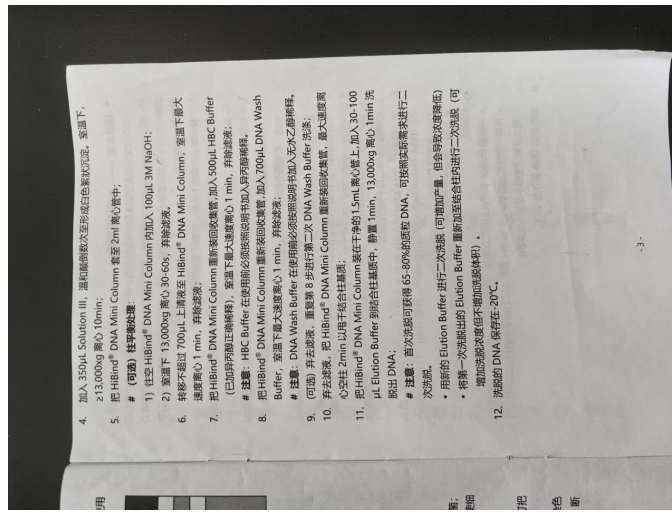
|                     |                                                                                                                                                                                                                                 |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 保持好实验室的卫生，东西用完要放回原位 |                                                                                                                                                                                                                                 |
| 个人防护                | <p>1. 在污染区操作必须戴手套，在无污染区操作不需要戴手套。戴手套在污染区操作后，回到无污染区操作必须摘下手套。禁止将污染区的东西拿到无污染区用，禁止将无污染区的东西拿到污染区用（例如量筒）。下图标明污染区、无污染区位置。</p>                        |
| 无菌操作规范              | <p>PCR用ep管需使用超净台里灭过菌的，水需使用超净台内无菌水</p> <p>在超净台内拿取无菌EP管、牙签时，必须用镊子夹取。</p> <p>超净台内配备专用镊子。</p> <p>灭菌的培养基、甘油、水等最好用锡纸封瓶口，硅胶塞也可。在超净台内打开后，锡纸可以在酒精灯火焰上稍微灼烧一下，但硅胶塞不能灼烧。锡纸易划伤皮肤，操作要小心。试管内分装的培养基在灭菌后可用锡纸包裹（省略）。灭菌完成的培养基放4℃保存（直接放在台子旁边了）。</p> |
| 仪器使用规范              | <p>离心机，PCR，灭菌锅等的使用都有实验记录本，每次用都要填写。</p> <p>离心机使用后需打开盖子，防止冷凝水流回机器。</p> <p>移液器使用完调回最大量程，枪头盒放回原位；</p> <p>大离心机使用时需配平、关紧大盖子；用后关电源并开盖。</p> <p>-80冰箱不能开太久，拿了东西尽快关门，长时间开门会导致结冰，打不开门；</p> <p>超净台开关位于操作者右腿附近；移液枪用后调回最大量程放回架子。</p>          |

|       |                                                                                                                                                                                                 |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 试剂管理  | 冰箱下层为-20℃，第一层存放公共试剂（如Marker、酶）， <b>用后及时归位。</b><br><br>超净台内试剂瓶开封后需重新密封。                                                                                                                          |
|       | LB培养基配方在称上面贴着（100ml的）<br><br>灭菌试剂瓶口需锡纸/硅胶塞密封。                                                                                                                                                   |
| 清洁与维护 | 污染区的手套很多，用完要丢弃在垃圾桶；<br><br>冰盒用完把水倒掉，放回原位，不要随意摆放；<br><br><b>实验台面用后需擦拭</b> ；枪头放回枪头盒指定位置；移液枪归位。<br><br>枪头可退至桌面任意纸盒。盒满后倒污染区旁垃圾桶；垃圾桶满后转移至实验室进门处垃圾桶。                                                  |
|       | TLC使用染色液和展开剂需要开通风。<br><br><b>层析缸（酸缸）顶盖磨砂面朝下，光滑面朝上</b><br><br>吹干使用通风橱吹风机（污染）。<br><br>TLC层析做完要把摇床关掉，然后试剂罐推到边上摆好，确认染色液瓶盖拧紧（易氧化变黑）；<br><br>染色板冲洗后吹干放回。<br><br>用来接多的染色液的那个板板拿到水池去冲水，用通风橱里到吹风机吹干后放回去。 |
| 废物处理  | 实验台垃圾盒满后倒入污染区旁垃圾桶；该垃圾桶满后打包，转移至实验室进门处垃圾桶。<br><br>污染区垃圾严格分区处理。垃圾不要放在桶盖上<br><br>灭菌锅灭完的废物要即时清洗，有些已经产卵有果蝇了。                                                                                          |

实验方案

提质粒





## 感受态制备-培养完成后全程冰上

- BL21(DE3)单菌落接种到5mL液体LB中，37°C 150rpm过夜培养
- 取2mL接种到200mL的中号锥形瓶中（500mL的），37°C 180rpm培养至OD600=0.4~0.5，转移到50mL离心管冰浴20min
- 4°C 3000rpm离心5min收菌，弃去上清
- 40mL冰冷CaCl<sub>2</sub>重悬，4°C 2500rpm离心5min，弃去上清
- 20mL冰冷CaCl<sub>2</sub>重悬，冰浴30min，4°C 2500rpm离心5min收菌，弃去上清
- 4mL冰冷CaCl<sub>2</sub>重悬，分装到EP管/PCR管中，每管70μL，-80°C冻存

## PCR；转化，涂板

- 根据涂布数量，配置LB【固体和液体】培养基，一个培养皿约20mL，121°C灭菌20min
- 【本步骤超净台中进行，PCR管，ddH<sub>2</sub>O和枪头都用台子里的，酶要放在冰里】

50μL体系

Prime Star ,dNTP, 5x PS Buffer在-20冰箱第一层公共试剂盒内（长条状的盒子）

**做好标记!!! 做好标记!!! 做好标记!!! 做好标记!!! 做好标记!!!**

**黑笔!!! 黑笔!!! 黑笔!!! 黑笔!!! 黑笔!!! 黑笔!!! 黑笔!!! 黑笔!!!**

先加量大的

|                                        |         |
|----------------------------------------|---------|
| Prime Star                             | 0.5μL   |
| 引物（正向+反向）                              | 1.3μL*2 |
| dNTP                                   | 4μL     |
| 5x PS Buffer                           | 10μL    |
| 质粒+ddH <sub>2</sub> O（补齐50μL）：一共32.9μL |         |

|                    |            |
|--------------------|------------|
| 质粒                 | 终浓度50ng/μL |
| ddH <sub>2</sub> O | 计算补齐50μL   |

- 质粒一般加 1μL 就行（E144X一二轮突变使用0.5μL）
- 放入PCR 仪，根据引物合成单上的T<sub>m</sub>设置退火温度，退火温度=T<sub>m</sub>-5，延伸温度设置为6：24

PyAly定点突变PCR程序（参考）：

|       |                   |               |
|-------|-------------------|---------------|
| 预变性   | 95℃               | 5min          |
| 18个循环 |                   |               |
| 变性    | 95℃               | 30s           |
| 退火    | T <sub>m</sub> -5 | 30s           |
| 延伸    | 72℃               | 1kb对应<br>1min |
| 18个循环 |                   |               |
| 终延伸   | 72℃               | 5min          |
| 保存    | 12℃               | ∞             |

- 【不一定超净台中】每个样品DPN I 1μL 37℃水浴消化1h（PCR管插到浮漂上，底部有液体的部分露出泡沫，使得其可以泡在水中）
- 【超净台中】向EP 管中加入3倍体积乙醇（153μL）+1/3体积NaAc（17μL），样品（50+1=51μL），将PCR管中样品完全转移到EP 管中并做好标记，-20℃醇沉30min
- 4℃ 12000rpm离心10min，倒掉上清液

【以下步骤涉及到感受态细胞时动作都要小心，轻拿轻放，轻轻吹打不要有气泡】

- 从-80冰箱第二层中小心取出大肠杆菌BL21感受态细胞，放入冰中融化（10min就行）
- 【超净台中】吸取EP管内感受态细胞（约50-70μL，取量程200μL的枪头后调量程70μL左右就行）加入离心后带有质粒的“空”EP管内，轻轻吹打，放入冰盒冰浴30min

（若使用-80保存的质粒，则需在ep管中先加入感受态细胞，再取4微升质粒于ep管）

- 42℃水浴60s热激（时间要准，准准的60s），随后拿出放入冰盒中冰浴2min（EP管插到浮漂上，底部有液体的部分露出泡沫，使得其可以泡在水中）
- 【超净台中】每个EP管加入500μL【不带抗性】的LB液体培养基，150rpm 37℃ 摇床振荡培养40min-1h



- 【超净台中】融化固体LB培养基，待降温至约55-60℃时加入千分之一氨苄抗性，混匀后迅速倒平板，待其凝固（混合质粒和感受态后配置）
- 培养后的EP管放入实验台上的小离心机中简单离心约2mi
- 【超净台中】每个EP管中约570μL液体，吸取约540-550μL的上清液弃去，使用剩下的液体轻轻吹打菌体沉淀，使其重悬，混匀后全部涂布到LB固体培养基上（涂布棒在超净台右手侧，金属的，用之前过酒精灯灼烧灭菌，冷却后再涂布）
- 培养皿套袋倒置，37度培养箱（废弃的摇床）在固体培养基上，过夜培养。

## 挑单克隆（测序）

【若使用第一遍测完序-80冻存的甘油菌/质粒，则省略测序，其余基本相同】

固体培养基上长出单菌落，用10μL枪头挑取单菌落，直接打到5ml LB液体培养基（加 5μL 氨苄 氨苄在冰箱下层 写了A）的试管中/反复吹打，150rpm 37℃振荡培养（大概 6 小时）。适时从试管中取 500μL放液体入EP管中做好标记，封入塑封袋内放到4℃ 冰箱中等待公司的人来取（下午五点前！）

## 接种，种子液，保种

LB培养基：蛋白胨1g，NaCl 1g，酵母粉0.5g，（固体时加：琼脂1.5g），加水100mL。每个1000ml 中型锥形瓶加300ml液体LB，试管中加5ml液体LB。121℃ 灭菌20min后备用。氨苄抗性均按照培养基体积的千分之一加入。

- 【超净台中】接种液体培养基：将试管缓慢放平，吸取EP 管内测序后的菌液，接种于培养基内。5ml LB培养基中加入：5μL氨苄（千分之一）+ 50μL菌液（百分之一）。
- 培养：接种后在试管上标记，试管斜插于摇床，摇床37℃ 220rpm培养约5h（靠上一排，最左边两个按钮调转速，最右边是启停），检测菌液浓度：OD600-培养基空白对照（取20微，然后加进去，最后结果要×2）

!!! 注意氨苄青霉素要放到-20（冰箱第一层），而菌种则在-80（PyAly和突变菌不在一起），分开放。

- 【超净台中】保种：取等量菌液与甘油（200或300 μL，甘油在超净台的瓶子里）放入EP 管中混匀，装入塑封袋，-80℃保存
- ()

## 扩培；诱导（IPTG）

LB培养基：蛋白胨1g，NaCl 1g，酵母粉0.5g，（固体时加：琼脂1.5g），加水100mL。每个1000ml 中型锥形瓶加300ml液体LB，试管中加5ml液体LB。121℃ 灭菌20min后备用。氨苄抗性均按照培养基体积的千分之一加入。

- 扩配：试管中种子液全部（或3ml）加到有LB 培养基的1000ml锥形瓶中，加入千分之一氨苄（300mL 培养基加300微），37℃ 180rpm培养至OD600=0.6（约2.5h 不要太久！3h就久了！用酶标仪测OD，直观方法：将锥形瓶放到有字的纸上，液体浑浊到看不清字）（摇床中使用了大一号的固定器时候需要拿足够的泡沫垫塞到瓶子和固定器中间，使得震荡时候锥形瓶不会动）

测量OD 200ul

- 诱导：【超净台中】加入IPTG（也在冰箱下层第一格，写着I）120 $\mu$ L（对应300mL培养基，IPTG母液浓度500mM，IPTG终浓度mM（？）），16 $^{\circ}$ C 180rpm培养18h

## 收菌

- 1000ml锥形瓶中所有液体全部倒入塑料瓶中，3000转 4 $^{\circ}$ C 大离心机中离心30min（配平，盖盖子，盖子的箭头对上壁上的箭头），离心后倒掉上清（培养基）
- 20mL超纯水清洗塑料瓶并震荡，使得沉淀重悬，洗涤液倒入50mL离心管，再用10mL超纯水清洗，合并洗涤液
- 配平，放入离心机中8000rpm 4 $^{\circ}$ C 离心15min
- 倒掉上清，如有需要放入-80冰箱中备用

## 超声破碎

【先取两盒冰回来，随时补充】冰盒在小房间门口，可以去科学馆二楼靠尽头左手侧的222（在靠学苑餐厅那侧）或化学馆侧门进去二楼左手边第一间实验室“借”

- 将得到的带沉淀的离心管放入有冰的泡沫盒中，加入20ml Tris（20mM Tris+200mM NaCl, pH 7.5）缓冲液，使用一次性塑料滴管搅拌重悬，过程中使用滴管吹打使沉淀重悬
- 取一个250mL烧杯中倒满冰，并加水没过离心管中的液体，离心管垂直放入烧杯中，用带孔的泡沫垫放在上方固定离心管（烧杯中水不要太多，冰不要太少）
- 擦干净超声用的探头，垂直插进离心管中距离底部1cm，不要碰到壁上
- 按确定开始超声12-15min，（2s超声4s停顿）确定声音正常后再离开
- 得到产物12000rpm 30min离心，保留上清，保留上清，保留上清，离心管整体及时放入冰盒中，保证所有蛋白始终保存在冰中
- 取1ml上清液至EP管中并做好标记，放入-20冰箱第1层中的袋子里保存。当天后续使用到样品的实验结束后，将剩余液体以及离心管一起放入-80冰箱第四层大袋子中保存

## SDS-PAGE

- 制胶：【**请去问师兄或者做过的，写得不是很清楚**】

一次性制两个板。取背板和前面的玻璃板，摆好压到夹板内，固定到固定器上。在两个板之间加入超纯水至前方小玻璃板上边缘，验漏，10min后观察液面下降情况，视情况后续多加分离胶。

使用架子上标有“分”的小锥形瓶，对照左侧纸上配置12% 10mL 2板分离胶，按顺序加入试剂（大部分都在架子上，上面都写了是啥，可以直接找到；AP在超净工作台对面的那个小冰箱侧边，是一个盖子上写了AP、管的周围用锡纸包起来的小ep管；TEMED在跑胶桌子下面的柜子里，一个褐色瓶子），注意Tris的pH；另外请注意，TEMED为促凝剂，加入后迅速成胶，加之前准备好后续工作想清楚怎么做再加。在小锥形瓶中摇匀后用1mL枪头注入到玻璃板之间，至固定器绿色上沿，随后马上按滴滴入乙醇去除气泡压平液面。

成胶后，倒掉乙醇并加入超纯水洗涤，n并倒掉超纯水，可以用纸巾吸干。

使用架子上标有“浓”的小锥形瓶，对照左侧纸上配置12% 10mL 2板浓缩胶，配置浓缩胶并加入，加到板的上沿，插入对应的齿梳。

全部成胶后，从固定器上取下板。将两个板上下叠放，上方的板滴满水，用保鲜膜多缠几圈后，放入4℃冰箱保存。

| 12%分离胶 10ml体系（2板）/mL |            | 浓缩胶 5ml体系（2板）/mL     |            |
|----------------------|------------|----------------------|------------|
| 水                    | 3.3        | 水                    | 3.3        |
| 30%聚丙烯酰胺             | 4.0        | 30%聚丙烯酰胺             | 0.84       |
| 1.5M Tris-HCl pH=8.8 | 2.5        | 1.5M Tris-HCl pH=6.8 | 0.75       |
| 10% SDS              | 0.1        | 10% SDS              | 0.05（50μL） |
| 10% 过硫酸铵AP           | 0.1        | 10% 过硫酸铵AP           | 0.05（50μL） |
| TEMED                | 0.004（4μL） | TEMED                | 0.01（10μL） |

- 安装：取胶板，放到专门的卡槽里上，上方凹槽对应卡进去，另一侧卡塑料板，扣上两侧扣子，固定器放入电泳缓冲液中，在两个胶板中间加入1x的缓冲液（不足时用5x的稀释，50ml 5x+950ml超纯水）至刚好没过胶板顶部，拔出齿梳
- 点样 & 电泳：EP管内加5μL Loading Buffer + 20μL样品（或用量对半砍），先加少的，100℃金属浴5min，样品点样4μL，Maker 点样5μL；183V 27mA电泳约1.5h，等蓝色条带完全跑出去后停止电泳

注：Maker在-20冰箱第一层，Loading Buffer在EP 管里

- 染色：脱模，放到染色剂里，开摇床轻轻摇动45min，轻轻拿出放到脱色剂中过夜脱色，之后放到水中洗脱，拍照

### TLC（薄层色谱层析）

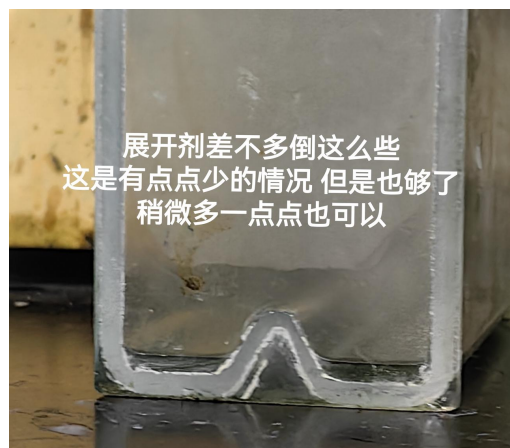
- 酶解：20/10/5/10/20μL上清液+80/90/45/40/40μL polyM（按顺序对应体积）。先在EP管中加polyM，再从冰中取一定量的上清液（酶）（不要用手握离心管中有酶的部分！）（加到polyM中，用手指弹一下后简单离心。室温反应2-2.5h。反应后放到加热板上100℃金属浴10min（拿出来时候盖子容易崩开，及时按回去避免液体蒸发导致浓度改变），12000转离心10min，（如需再用0.22μm滤膜过滤）。反应后样品需要重复使用的话放入4℃冰箱中
- 剪TLC板(20cm\*20cm)：对半剪开，底部1.5cm处铅笔划线，隔0.8-1cm点样，点样6μL，
- 点样：

1.垂直轻触：移液枪头垂直、轻轻接触薄层板点样位置。接触瞬间即抬起，让样品溶液依靠毛细作用自然吸附到板上。切勿用力按压或戳破硅胶层！

2.少量多次：可以一次吸3 $\mu$ L再分次推出，每次点样量宜少（nL级）。待前一次点的溶剂完全挥发干透后（无湿润痕迹），再点下一次。重复2-5次，形成直径1-3 mm的紧密原点。快速轻点：动作要快，避免毛细管接触板面时间过长导致原点扩散过大。理想原点呈小而致密的圆点。

- 点1 $\mu$ L后吹半干后（避免盐度过高时候形成晶膜无法点样）再点下1 $\mu$ L

【以下所有步骤在通风橱内进行，戴手套戴手套戴手套，开通风开通风开通风】



- 放入酸缸里层析（使用镊子夹板的上部，垂直放入缸内，上半部分靠在缸的壁上），层析约35-45min，至展开剂扩散到距顶端1cm
- 取出，使用通风橱内吹风机吹干/直接风干（顺便干其他的去）
- 在通风橱内，检查显色剂是否变灰变黑，变黑变浑则不要使用，配新的。使用1mL移液枪吸取显色剂在上方染色，从顶端缓慢推出显色剂，重复染色，使得显色剂覆盖展开液经过的所有区域。直接从左至右快速倒出染色液到TLC板上，使其覆盖均匀。用通风橱内吹风机吹干。





- 拉下通风橱挡板，使用通风橱内的酒精灯烤干至显示条带。烤的过程可选择不开通风，飘烟时立刻打开通风，然后再关掉继续烤，最后立刻打开通风，立刻打开通风，立刻打开通风
- 如何减少TLC的边缘效应？

- 1.保证展开剂饱和，开关酸缸盖子幅度尽量小。从而增加层板缸中溶剂蒸气浓度。
- 2.剪去板子下方边缘两脚一点。

- 试剂配方

展开剂:

**酸性展开剂（体积比）：正丁醇:甲酸:水=4:6:1；**

**碱性展开剂（体积比）：异丙醇:水:氨水=60:30:4**

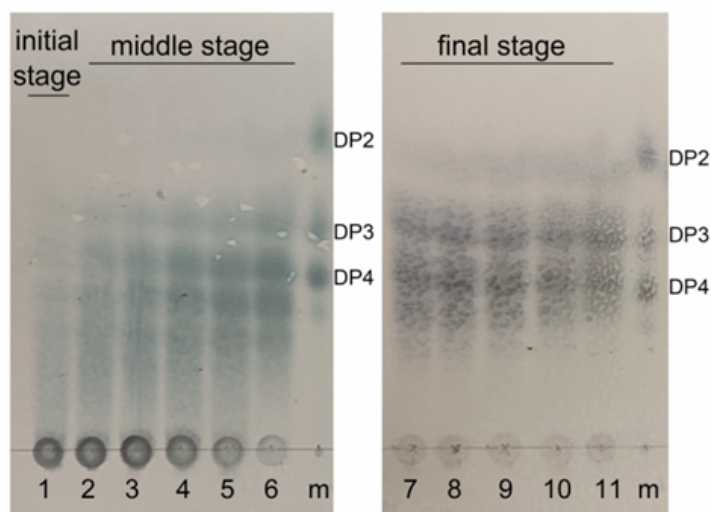
显色剂（大毒品混合物，**现配现用**，配置时候按顺序加入试剂，加到用锡纸包起来的小的广口瓶里，加入一个试剂就摇匀，全加完后放到通风橱内水平摇床上缓慢摇晃约30min）：

**1** 二苯胺:2g； **2** 苯胺:2mL； **3** 丙酮:100m； **4** 磷酸:10mL； **5** 浓盐酸:1mL

- TLC结果分析可以看最早老师发的论文中补充图7下的解释：

翻译：

根据上述特征，长链底物的量可作为将整个降解过程分为三个阶段的标准。由于长链底物的分子量较高，无法通过薄层色谱法（TLC）分



Supplementary Figure 7 The alginate degradation process of alginate lyase AXP82114. 原文: Based on the features described above, the amount of the long-chain substrate can be used as the criterion to divide the whole degradation process into three stages. Due to their high molecular weights, long-chain substrates cannot be separated by TLC, and instead remain at the origin. Thus, the amount of long-chain substrate can be estimated by the color at the origin (if the color changes from dark to light, this indicates that the amount of long-chain substrate decreased). A large

amount of long-chain substrate and few oligosaccharides were observed in lane 1, indicating that the degradation process was in the initial stage.

Lanes 2-6 show that the amount of long-chain substrate decreased continuously along with increasing amounts of oligosaccharides, indicating that the degradation process was in the middle stage.

Only oligosaccharides were observed in lanes 7-11, indicating that the degradation process was in the final stage. After determination of the middle stage, the following question was which reaction timepoint

during this stage should be selected for product preparation. The reaction timepoint close to the end of the middle stage was easy to identify by TLC analysis, and the product generated at this timepoint

seldom contained long-chain substrates, which facilitated subsequent HPLC analysis. Therefore, the product close to the end of the middle stage (here, 1 h

for alginate lyase AXP82114) was prepared for Dp specificity comparison. Lane m: unsaturated oligosaccharides (DP2, DP3, and DP4). Lanes 1—11: the degradation products collected at 1 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 1 h, 3 h, 5 h, 9 h, 11 h and 24 h, respectively.

离, 而是停留在原点。因此, 长链底物的量可通过原点处的颜色来估计 (如果颜色由深变浅, 则表明长链底物的量减少)。在第 1 条泳道中观察到大量长链底物和少量低聚糖, 表明降解过程处于初始阶段。第 2 至 6 条泳道显示, 随着低聚糖量的增加, 长链底物的量持续减少, 表明降解过程处于中期。在第 7 至 11 条泳道中仅观察到低聚糖, 表明降解过程处于最终阶段。确定中期后, 接下来的问题是应选择该阶段的哪个反应时间点来制备产品。通过薄层色谱分析很容易确定中段接近尾声时的反应时间点, 此时生成的产物很少含有长链底物, 这有利于后续的高效液相色谱分析。因此, 准备了接近中段尾声时 (此处为 1 小时) 的产物进行 Dp 特异性比较。泳道 m: 不饱和低聚糖 (DP2、DP3 和 DP4)。泳道 1 - 11: 分别在 1 分钟、5 分钟、10 分钟、20 分钟、30 分钟、1 小时、3 小时、5 小时、9 小时、11 小时和 24 小时收集的降解产物。



前期定点突变简并密码子设计（K172X&R143X）

简并碱基代码

| 代码 | 碱基         | 代码 | 碱基      |
|----|------------|----|---------|
| R  | A, G       | Y  | C, T    |
| K  | G, T       | S  | G, C    |
| M  | A, C       | W  | A, T    |
| B  | G, C, T    | V  | A, G, C |
| D  | A, G, T    | H  | A, C, T |
| N  | A, G, C, T |    |         |

所有的种子液：

K172  
GYDPCSWATQ  
R143  
SPG DML WYA

需要设计简并密码子，使剩余的氨基酸（）

K172  
EHIKLN RVFM  
R143  
CEFIKNQRTV

基本被覆盖不冗余。——分类氨基酸（按照简并性）

HPLC（反向色谱）

## 22种天然氨基酸的结构与性质

### Structures and Properties of 22 Natural Amino Acids

参考资料：  
生物化学原理 (第3版), 杨笑武 著  
Lehninger Principles of Biochemistry (3rd Edition), by David L. Nelson & Michael M. Cox

|                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>MW = 133.10<br/>pI = 2.77<br/>C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>4</sub><br/>酸性</p> <p><b>Asp (D)</b><br/>Aspartic acid<br/>天冬氨酸</p> <chem>OC(=O)C(N)C(=O)O</chem>                      | <p>MW = 147.13<br/>pI = 3.22<br/>C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>4</sub><br/>酸性</p> <p><b>Glu (E)</b><br/>Glutamic acid<br/>谷氨酸</p> <chem>OC(=O)CC(N)C(=O)O</chem>                                    | <p>MW = 188.05<br/>C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>Se<br/>酸性</p> <p><b>Sec (U)</b><br/>Selenocysteine<br/>硒代半胱氨酸</p> <chem>OC(=O)C(N)CS</chem>                          | <p>MW = 75.07<br/>pI = 5.97<br/>C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub><br/>中性非极性</p> <p><b>Gly (G)</b><br/>Glycine<br/>甘氨酸</p> <chem>NC(=O)O</chem>                                              |
| <p>MW = 89.09<br/>pI = 6.01<br/>C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub><br/>中性非极性</p> <p><b>Ala (A)</b><br/>Alanine<br/>丙氨酸</p> <chem>CC(N)C(=O)O</chem>                                | <p>MW = 115.13<br/>pI = 6.48<br/>C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub><br/>中性非极性</p> <p><b>Pro (P)</b><br/>Proline<br/>脯氨酸</p> <chem>C1CCN(C1)C(=O)O</chem>                                         | <p>MW = 117.15<br/>pI = 5.97<br/>C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub><br/>中性非极性</p> <p><b>Val (V)</b><br/>Valine<br/>缬氨酸</p> <chem>CC(C)C(N)C(=O)O</chem>                  | <p>MW = 131.18<br/>pI = 5.99<br/>C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub><br/>中性非极性</p> <p><b>Leu (L)</b><br/>Leucine<br/>亮氨酸</p> <chem>CC(C)CC(N)C(=O)O</chem>                                   |
| <p>MW = 131.18<br/>pI = 6.02<br/>C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub><br/>中性非极性</p> <p><b>Ile (I)</b><br/>Isoleucine<br/>异亮氨酸</p> <chem>CC[C@H](C)[C@H](N)C(=O)O</chem>              | <p>MW = 149.21<br/>pI = 5.74<br/>C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>S<br/>中性非极性</p> <p><b>Met (M)</b><br/>Methionine<br/>甲硫氨酸</p> <chem>CSCC[C@H](N)C(=O)O</chem>                                | <p>MW = 165.19<br/>pI = 5.48<br/>C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub><br/>中性非极性</p> <p><b>Phe (F)</b><br/>Phenylalanine<br/>苯丙氨酸</p> <chem>c1ccc(cc1)C[C@H](N)C(=O)O</chem> | <p>MW = 204.23<br/>pI = 5.89<br/>C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><br/>中性非极性</p> <p><b>Trp (W)</b><br/>Tryptophan<br/>色氨酸</p> <chem>c1ccc2c(c1)c(c[nH]2)C[C@H](N)C(=O)O</chem> |
| <p>MW = 105.09<br/>pI = 5.88<br/>C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub><br/>中性极性</p> <p><b>Ser (S)</b><br/>Serine<br/>丝氨酸</p> <chem>OC[C@H](N)C(=O)O</chem>                            | <p>MW = 119.12<br/>pI = 5.87<br/>C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub><br/>中性极性</p> <p><b>Thr (T)</b><br/>Threonine<br/>苏氨酸</p> <chem>CC(O)[C@H](N)C(=O)O</chem>                                    | <p>MW = 121.16<br/>pI = 5.07<br/>C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>S<br/>中性极性</p> <p><b>Cys (C)</b><br/>Cysteine<br/>半胱氨酸</p> <chem>SC[C@H](N)C(=O)O</chem>               | <p>MW = 132.12<br/>pI = 5.41<br/>C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>3</sub><br/>中性极性</p> <p><b>Asn (N)</b><br/>Asparagine<br/>天冬酰胺</p> <chem>NC(=O)[C@H](N)C(=O)O</chem>                             |
| <p>MW = 146.15<br/>pI = 5.65<br/>C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><br/>中性极性</p> <p><b>Gln (Q)</b><br/>Glutamine<br/>谷氨酰胺</p> <chem>NC(=O)CC[C@H](N)C(=O)O</chem>     | <p>MW = 181.19<br/>pI = 5.66<br/>C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub><br/>中性极性</p> <p><b>Tyr (Y)</b><br/>Tyrosine<br/>酪氨酸</p> <chem>c1ccc(cc1)C[C@H](N)C(=O)O</chem>                               | <p>MW = 146.19<br/>pI = 9.74<br/>C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><br/>碱性</p> <p><b>Lys (K)</b><br/>Lysine<br/>赖氨酸</p> <chem>C(CCN)CC[C@H](N)C(=O)O</chem>  | <p>MW = 155.16<br/>pI = 7.59<br/>C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub><br/>碱性</p> <p><b>His (H)</b><br/>Histidine<br/>组氨酸</p> <chem>c1c[nH]cn1C[C@H](N)C(=O)O</chem>                |
| <p>MW = 174.20<br/>pI = 10.76<br/>C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub><br/>碱性</p> <p><b>Arg (R)</b><br/>Arginine<br/>精氨酸</p> <chem>NC(=[NH2+])NCCC[C@H](N)C(=O)O</chem> | <p>MW = 255.32<br/>pI = 5.66<br/>C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub><br/>碱性</p> <p><b>Pyl (O)</b><br/>Pyrrolysine<br/>吡罗赖氨酸</p> <chem>C1=CN[C@H](C1)C(=O)NCCCC[C@H](N)C(=O)O</chem> | <p>Pro (P) — 三字母缩写(英文/缩写)</p> <p>Proline — 英文名称</p> <p>脯氨酸 — 中文名称</p> <p>中性非极性氨基酸</p> <p>酸性氨基酸</p> <p>碱性氨基酸</p> <p>化学结构式(中性)</p> <chem>C1CCN(C1)C(=O)O</chem>                   |                                                                                                                                                                                                    |

氨基酸表.pdf

HPLC 使用指南  
在实验之前仔细阅读使用说明

1. 样品制备:
  - ① 样品溶解尽量与流动相比比例一致, 或直接用流动相溶解
  - ② 蛋白、脂类会导致色谱柱劣化, 做除蛋白脱脂前处理
  - ③ 样品上样前必须使用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤, 水系样品使用黄色水系滤膜过滤, 样品中含有机相用有机系绿色滤膜过滤
2. 根据使用柱子选择合适的流动相, 超声 20 min 除气泡。(一般四个泵瓶摆放位置 A 水、B 乙腈、C 甲醇、D 10% 甲醇)
3. 打开 HPLC 仪器四个开关, 等待仪器自检完再打开电脑和程序
4. 目的: 给所需泵排气泡。

先拧松 HPLC 泵阀, 将所需泵用 100% 溶液冲洗, 打开软件程序冲洗, 待观察到无气泡排出可以手动关掉冲洗或等冲洗程序自动停止。拧紧 HPLC 泵阀。
5. 目的: 冲洗管路置换上一个使用人遗留的流出液。

先不接柱子, 只打开马达, 设置之后所用流动相, 流速 1ml/min, 流洗约 3min 置换。
6. 接色谱柱
  - ① 将马达流速降至 0.2ml/min 接柱, 流速设置: 以 0.2ml/min 开泵, 0.2  $\rightarrow$  0.4  $\rightarrow$  0.6 这样梯度升高至使用流速。降速时也同时逐渐降低流速。
  - ② 在管路有液体流出时接柱, 防止进气
  - ③ 注意柱子箭头标识, 勿接反柱子
  - ④ 检验柱子两端不漏液
7. 如需升温使用, 在 0.2ml/min 低流速下开启柱温, 等到温度升上去后, 再将流速逐步调节至使用流速。

分析结束时千万不能高温停泵, 应该先逐步将流速降低至 0.2ml/min, 关闭柱温, 等温度恢复至室温后, 再关闭流速。
8. 实验室共有两个检测器, 包括紫外和蒸发光检测器。

若需使用蒸发光散射仪器 (ELSD), 先打开氮气和蒸发光检测器, 再打开 HPLC, 待 ELSD 的 signal 和 Tm 稳定, 打开电脑监视基线稳定后可以上样。实验时将排废气管伸到窗外。

使用完成后先关 HPLC, 再关蒸发光检测器和氮气防止试剂倒流。(如需长时间冲洗柱子避免浪费氮气, 可将连接柱子与 ELSD 的线断开, 直接用废液瓶接柱子流出液)
9. HPLC 是自动上样模式, 将样品打到样品瓶针管中, 打到针管中样品至少要比程序上样量多 5  $\mu\text{L}$ , 进样针会自动清洗。
10. 使用柱子后, 由于氨基柱寿命短等原因, 请将氨基柱保存在 100% 乙腈中拆下放回原位, 可将 C18 柱连接在 HPLC 仪器上。
11. 实验结束, 清洗干净样品瓶, 超声烘干, 及时倒掉实验产生的废液。氮气管不能深入废液液面以下影响基线稳定。

## A TBAB B 乙腈 (极性溶剂)

C 甲醇 D 10% 甲醇

注意事项:

1. 检查四个柱子所连液体是否正确 换柱子时确保不接触到其他地方
2. 第二层确保连到 C18 (非极性柱子) 换柱子找师姐
3. 补充试剂-休息室药品柜

钥匙: 1 师姐一把 2 休息室左边走廊尽头师姐一把

TABA: 5mmol/L 1L 1.61185

唯一需要超滤的 0.1 档位

所有试剂都需要超声 保鲜膜封住戳孔

1. 写实验室记录本 (最高 bar 值)
2. bar 超过 300 跟师兄说
3. 一个样 42min 一天最多 11 样

一. 准备工作

• 仪器四个开关依次打开

- 开电脑：长按下面按钮
- 打开变色龙软件，将四个模块点击连接
- 第三个 温度控制 on
- 第四个 打开紫外线
- 注意如果点击没反应，需要等一会，不要一直点

- （安装上色谱柱后，使用10%甲醇再次冲洗至少30min，置换色谱柱内保存溶剂）这一步若前一天使用过柱子，并保证柱子充分浸泡在甲醇溶液中，那么可省略，若很久不用则需要预先冲洗。
- 排气：使用流动相对流动相所在的泵进行排空气。

（你的流动相是什么就对哪些泵排气，这里使用AB泵，那么仅需使用AB排气）打开排气阀使用1ml/min的流速排气泡（5min），观察到没有气泡即可）。

【△排气阀拧松！！！结束（结束排气和混合流动相后，开始接柱子跑程序前）记得拧紧，冲洗时拧紧会导致压力（bar）值过高】

| 色谱柱内径  |        |        |        |        |
|--------|--------|--------|--------|--------|
| 柱长(mm) | 1.0 mm | 2.1 mm | 3.0 mm | 4.6 mm |
| 30     | 0.024  | 0.10   | 0.21   | 0.50   |
| 50     | 0.039  | 0.17   | 0.35   | 0.83   |
| 75     | 0.059  | 0.26   | 0.53   | 1.25   |
| 100    | 0.079  | 0.35   | 0.71   | 1.66   |
| 150    | 0.12   | 0.53   | 1.07   | 2.49   |

色谱柱体积表(mL)

公众号 · 我是张土豆耶

- 平衡色谱柱：用至少10倍柱体积的初始流动相来平衡柱子，当基线稳定，开始进样。排掉柱子中的洗涤液（甲醇），使柱内填料充分饱和，确保基线稳定。
- 【检测前】调整到程序初始的流动相比比例（我记得初始流动相比比例是A：B=8:2忘却了需要确认）
- 【不关排气阀】先不接柱子，只打开马达，用所设置的流动相流速 1ml/min，流洗约 3min，充分混匀两种不同比例的流动相。
- 【关上排气阀】接色谱柱

接柱子前降流速！！

注意△初始流速一定要小

- ① 将马达流速降至 0.2ml/min 接柱（在0.2mL/min 低流速下开启柱温，等到温度升上去后，再将流速逐步调节至使用流速。）流速设置：以 0.2mL/min 开泵，0.2

-0.4-0.6 这样梯度升高至使用流速。降速时也同时逐渐降低流速。

- ② 在管路有液体流出时接柱，防止进气
- ③ 注意柱子箭头标识，勿接反柱子
- ④ 检验柱子两端不漏液

需要💡 计算一下冲洗时间（我忘记了）

- {一个歪打正着自创的邪修方式🤪可以替代手动平衡色谱柱，就是取流动相作为样品空跑一次程序，这样第一次基线不会平但是之后的样品会很美丽（理所当然地，这个样品不能作为基线数据扣空白）但是耗时耗力，不推荐。} 我们的程序基线不是随时都是平的，存在梯度过柱子的设定（需补充图片）

二. 点样:

1. 离心机离心
2. 抽屉- 三个部分，里面用新的 样里面不能有气泡 注射器用完针头拔掉烘干
3. 黄色滤头 用完到超滤那里找
4. 200ul 枪头 上清尽可能吸出来 边打边吸针管 有些针头难拉要小心
5. 针管头插进滤膜里，样品轻轻甩到针管底部
6. 试剂瓶中间部分底部拔下来 弹出空气 组装好 编号!!!

三.开始实验

1. 确保流速小于0.5 (0.2)
2. 设置程序（已经是预制菜）：点击马达，数据-zwh-idec 命名:日期+样 （名称+位置）；设置位置 RA1 -继续-保存；直接点运行开始跑

（如果出现）队列-移除别人的

??? 以下为待核对内容

跑乙腈柱子B马达（5-10min）

取200ul乙腈样、放样

四. 处理峰:

- 1.校正：扣除基线（结果足够好时并不影响计算峰面积，但是作图时需使基线接近0，故若跑了乙腈（空白对照，需要先行扣除基线。

12min二糖

15min 三糖

16-17min四糖



2.手动切割峰12min 往后依次取到6糖积分峰面积： 点击 处理-删除所有峰-二三糖之间选最低点往右往左分别取水平线 在各个峰左右最低点分割峰

(有时保留时间紊乱无法确定峰归属，我不知道凭经验判断的😏)

3.计算峰面积： 点击-结果-峰面积

五.结束实验工作

最后一个样取完可以开始清洗

试剂瓶和针管 冲洗：自来水＋纯水

自来水三遍 纯水两遍 超声10min 换纯水 再超10min

仪器结束操作：

bar上限调到300、 废液缸（超过一半即倒）

流速0.2 将D调到100%

检测器 紫外和连接关闭

关闭仪器最底下的开关（继续做）

电脑

实验进度及结果

实验进度

|                 | 第一轮       | 第二    |                 | 第七轮     | 第八轮          | 第  |
|-----------------|-----------|-------|-----------------|---------|--------------|----|
| 野生型对照           |           |       | 样品突变类型<br>R159  |         | EC I P L V Q | 第  |
| 样品突变类型K172      | G Y D P C | A S T | 样品突变类型<br>F170  | Y H V T |              |    |
| 样品突变类型R143      | G S P     | L D M | PCR；转化；涂板；挑单克隆； | 7.16午   |              | 8. |
| PCR；转化；涂板；挑单克隆； | 1         | 1     | 挑单克隆（送测）        | 7.17    | 7.31         | 8. |
| 挑单克隆（测序）        | 1         | 1     | 接种，种子液          | 7.21    | 7.31         | 8. |
| 接种，种子液          | 5.27早     | 5.28  | 扩培；诱导（IPTG）扩培   | 7.21    | 7.31         | 8. |
| 扩培；诱导（IPTG）扩培   | 5.27午     | 5.29  | 收菌              | 7.22    | 8.1          | 8. |
| 收菌              | 5.28中午    | 5.29  |                 |         |              |    |
|                 |           |       |                 |         |              |    |

|          |           |      |          |              |             |    |
|----------|-----------|------|----------|--------------|-------------|----|
| 重悬，超声破碎  | 1         | 6.5T | 重悬，超声破碎  | 7.22         | 8.1         | 8. |
| SDS-PAGE | 4.22晚(失败) | 6.5时 | SDS-PAGE | 待做           | 8.8&8.9     |    |
| TLC      | 4.22晚(失败) | 6.5时 | TLC      | 7.23<br>7.24 | 8.7（失败，取几个通 |    |
| HPLC     | 7.22-7.28 |      | HPLC     |              |             |    |

|             | K172       | R143              | F170 | R159   | E1 |
|-------------|------------|-------------------|------|--------|----|
| • A：丙氨酸Ala  | 2          | 1                 | 11   | 10     |    |
| • C：半胱氨酸Cys | 1          | 5                 |      | 8      |    |
| • D：天冬氨酸Asp | (1)<br>, 3 | 1                 | 11   | 10     |    |
| • E：谷氨酸Glu  | 4          | (6)<br>(6.5)<br>) | 11   | 8      |    |
| • F：苯丙氨酸Phe | 4          | 5                 | /    | 10     |    |
| • G：甘氨酸Gly  | (1)<br>(3) | 1                 |      | 9      |    |
| • H：组氨酸His  | 4          | 5                 | 7    | 9      |    |
| • I：异亮氨酸Ile | 4          | 6                 | 11   | 8      |    |
| • K：赖氨酸Lys  | /          | 5                 |      | 10     |    |
| • L：亮氨酸Leu  | 4          | 1                 |      | 8      |    |
| • M：甲硫氨酸Met | 4          | 1                 |      | 10     |    |
| • N：天冬酰胺Asn | 6          | 6                 |      | (9) 10 |    |
| • P：脯氨酸Pro  | 1          | 1                 |      | 8      |    |
| • Q：谷氨酰胺Gln | 3          | 5                 | (11) | 8      |    |
| • R：精氨酸Arg  | 4          | /                 | 11   | /      |    |
| • S：丝氨酸Ser  | 2          | 1                 |      | 9      |    |

下方数字代表第x轮进行，带小括号数字如（1）代表第1轮做的但是菌死了/没长出来

更新：8.7

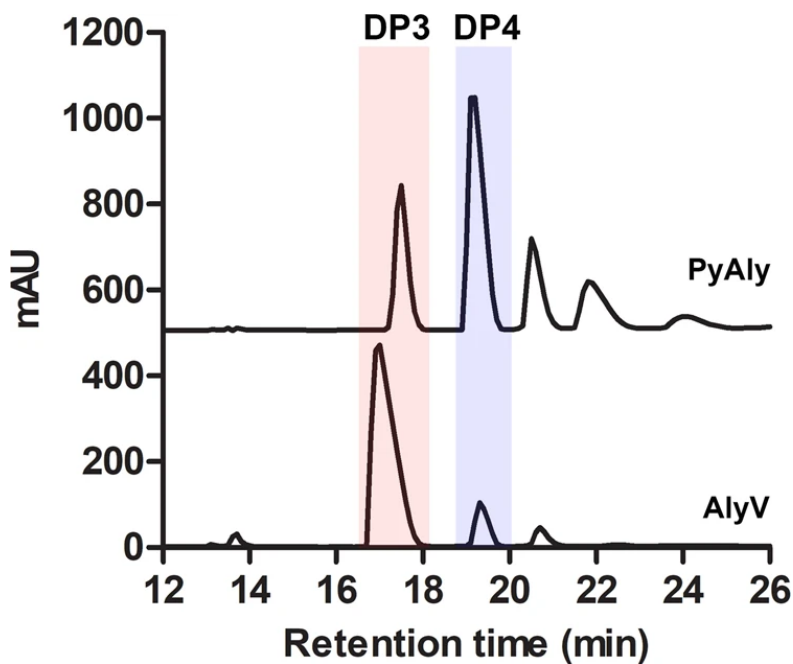
|             |        |   |   |   |  |
|-------------|--------|---|---|---|--|
| • T: 苏氨酸Thr | 2      | 5 | 7 | 9 |  |
| • V: 缬氨酸Val | 6      | 5 | 7 | 8 |  |
| • W: 色氨酸Trp | 2      | 1 |   | ? |  |
| • Y: 酪氨酸Tyr | (1) ,3 | 1 | 7 | 9 |  |

实验结果

 IDEC-7.28.zip  
58.82MB

 峰.zip  
5.32MB





上图为PyAly产物分布图（下图为AlyV）

Supplementary Table 4 The hydrogen bonds formed between PyAly and six sugar units.

| Subsite | Sugar atom | Amino acid | Distance (Å) |
|---------|------------|------------|--------------|
| -3      | O6A        | Arg143/NE  | 2.92         |
|         | O6B        | Arg143/NH2 | 2.88         |
| -2      | O2         | Arg136/NH2 | 2.90         |
|         |            | Lys172/NZ  | 3.04         |
|         | O3         | Lys172/NZ  | 3.00         |
| -1      | O1         | Tyr223/OH  | 2.58         |
|         | O4         | Arg136/NH1 | 3.24         |
|         | O6A        | Arg159/NH2 | 2.93         |
|         | O6B        | Arg159/NE  | 2.84         |
| +1      | O2         | Lys131/O   | 2.60         |
|         | O6A        | Arg84/NH1  | 3.21         |
|         |            | Arg84/NH2  | 3.05         |
|         | O6B        | Gln123/NE2 | 3.28         |
| +2      | O2         | Gln46/OE1  | 2.88         |
| +3      | O1         | Asp55/OD2  | 3.26         |
|         | O6A        | Arg88/NH2  | 3.01         |
|         | O6B        | Arg88/NE   | 2.80         |
|         |            | Lys44/NZ   | 2.49         |
|         | O5         | Lys44/NZ   | 3.19         |

Zhang K, Li Z, Zhu Q, Cao H, He X, Zhang XH, Liu W, Lyu Q. Determination of oligosaccharide product distributions of PL7 alginate lyases by their structural elements. Commun Biol. 2022 Aug 2;5(1):782.

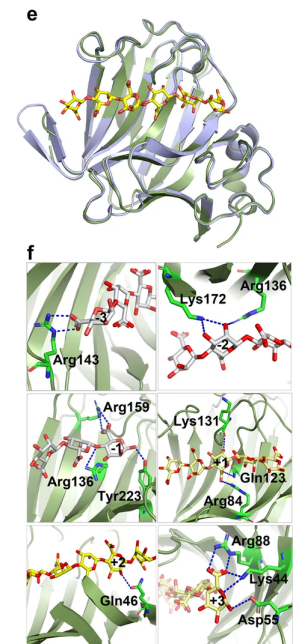
-3 位点：Arg143 的侧链与 C-5 位的羧基形成了两条氢键。

-2 位点：Lys172 的侧链与 C-2 和 C-3 位的羟基形成了氢键；Arg136 的侧链与 C-2 位的羟基形成了一条氢

| Subsite | 关键残基   | 作用类型                          |
|---------|--------|-------------------------------|
| -3      | Arg143 | 与 C-5 羧基形成两个氢键                |
| -2      | Lys172 | 与 C-2 和 C-3 羟基形成氢键            |
|         | Arg136 | 与 C-2 羟基形成氢键                  |
| -1      | Arg159 | 与 C-5 羧基形成两个氢键                |
|         | Tyr223 | 与 C-4 羟基形成氢键                  |
| +1      | Arg84  | 与 C-4 糖苷氧相互作用                 |
|         | Gln123 | 与 C-5 羧基形成一个氢键                |
| +2      | Lys131 | 与 C-2 羟基形成氢键                  |
|         | Gln46  | 与 C-2 羟基形成氢键                  |
| +3      | Arg88  | 与 C-5 羧基形成两个氢键                |
|         | Lys44  | 与 C-5 羧基形成一个氢键，并与糖环的 O 原子相互作用 |
|         | Asp55  | 与 C-5 羧基形成氢键                  |

目前我们突变的位点中：

1. K172,R143为底物作用的关键残基，分别作用于-3&-2号结合糖
2. F170,R159为PyAly的loop2区段，虽然loop2的长度并不决定产物分布，但是loop2的“端点”，并且后者在图示中参与酶-底物作用
3. loop1的长度与四糖产物分布呈反比，PyAly的loop1：较短，不直接参与结合，但影响结合口袋的几何形状；PyAly的loop2：直接参与底物结合，影响 subsite -1 和 -2 的识别；两者共同决定 PyAly 倾向于生成较大寡糖（如四糖）的产物分布特征。





键。

-1 位点：Arg159 的侧链与 C-5 位的羧基形成了两条氢键；Tyr223 的侧链与 C-1 位的羟基形成了一条氢键；Arg136 的侧链与 C-4 位的糖苷氧原子发生相互作用。

+1 位点：Arg84 的侧链与 C-5 位的羧基形成了两条氢键；Gln123 的侧链与 C-5 位的羧基形成了一条氢键；Lys131 的侧链与 C-2 位的羟基形成了一条氢键。

+2 位点：Gln46 的侧链与 C-2 位的羟基形成了一条氢键。

+3 位点：Arg88 的侧链与 C-5 位的羧基形成了两条氢键；Lys44 的侧链也与 C-5 位的羧基形成了一条氢键，此外，Lys44 的侧链还与糖环上的氧原子相互作用；Asp55 的侧链与 C-1 位的羟基形成了一条氢键。

- 4. E144:野生型结合口袋范围内残基突变
- 5. loop1PyAly: Thr108-Lys117; loop2PyAly: Arg159-Phe170

## 1. R159普遍四糖含量较多，但是酶活性不好，怎么保证变量是单一的？（四糖多只是突变引起的而不是没反应完全导致的）

首先这个问题是整个实验控制变量方法的一个最容易发现的漏洞，因为确实r159活性普遍较差，我们最理想的情况是控制糖（底物一定）用量，酶（调齐活力单位）用量，反应温度，反应时间，**保证完全反应**，

可惜不能，酶的效价（这个概念已经包括了调齐）太低，所以我们被迫调整其他动力学参数为“∞”（即反应时间无限），则有？

### 1 Michaelis-Menten 动力学极限

反应速率为：

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

当  $t \rightarrow \infty$  时，底物浓度  $S$  随时间变化由微分方程：

$$\frac{d[S]}{dt} = -\frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

积分得到底物随时间的变化曲线。

- 在极限情况下,  $S$  由 不可逆反应 + 底物浓度无限稀释 决定。
- 如果酶不失活，理论上 底物可以完全转化 ( $[S] \rightarrow 0$ )。

此时由于

我的想法是，首先r159处理方式和k172相同，都是反应之后补加酶然后过夜反应；其次是虽然没能将糖裂解完，但是反应到达了终点（后面不知怎么说了）；然后是处理方式，采用分峰拟合，一定程度上规避了底物剩余的问题，

- 如果考虑酶随时间失活：

$$V_{\max}(t) = k_{\text{cat}}[E]_0 e^{-k_d t}$$

代入微分方程：

$$\frac{d[S]}{dt} = -\frac{k_{\text{cat}}[E]_0 e^{-k_d t} [S]}{K_m + [S]}$$

## 实验日程记录

5月17日

桑雨晴 曹议之 赵明扬 刘诚玉

与师兄沟通实验方案，引物设计，干实验思路

5月18日

张松奕 南以雅 冯竞逸 曹议之 刘诚玉

提取质粒，饱和定点（143）突变PCR，配置LB培养基（用于转化）

（没有进行DNA准确定量，凭经验确定）

### ★ 用户自备仪器及耗材：

- ✓ 无水乙醇、异丙醇
- ✓ 离心速度可达 13,000xg 的离心机
- ✓ 涡旋仪
- ✓ 细菌培养瓶
- ✓ 无菌无酶的 1.5 或 2mL 离心管
- ✓ (可选) 无菌水、3M NaOH、温度可达 70°C 的孵育装置

### ★ 提取步骤 —— 离心方案

1. 取 1.0~5.0mL 过夜培养的菌液，室温下 10,000xg 离心 1min 收集细菌；
2. 弃除上清培养基，加入 250μL Solution I/RNaseA 混合液，漩涡振荡使细菌完全分散；  
# 注意：Solution I 使用前必须加入 RNase A。
3. 往重悬液中加入 250μL Solution II，轻轻颠倒数次混匀，如有必要，可把裂解液置于室温静置 2-3min；  
# 注意：避免剧烈混合裂解液，静置时间不应超过 5min，否则会使染色体 DNA 断裂而使质粒纯度降低。静置时间过长可能会导致质粒 DNA 断裂（当使用完 Solution II 以后，须盖紧瓶盖保存）。

4. 加入 350μL Solution III，温和颠倒数次至形成白色絮状沉淀。室温下，≥13,000xg 离心 10min；
5. 把 HiBind® DNA Mini Column 套至 2ml 离心管中；  
# (可选) 柱平衡处理：  
1) 往空 HiBind® DNA Mini Column 内加入 100μL 3M NaOH；  
2) 室温下 13,000xg 离心 30-60s，弃除滤液。
6. 转移不超过 700μL 上清液至 HiBind® DNA Mini Column，室温下最大速度离心 1 min，弃除滤液；
7. 把 HiBind® DNA Mini Column 重新装回收集管，加入 500μL HBC Buffer（已加异丙醇正确稀释），室温下最大速度离心 1 min，弃除滤液；  
# 注意：HBC Buffer 在使用前必须按照说明书加入异丙醇稀释。
8. 把 HiBind® DNA Mini Column 重新装回收集管，加入 700μL DNA Wash Buffer，室温下最大速度离心 1 min，弃除滤液；  
# 注意：DNA Wash Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。
9. (可选) 弃去滤液，重复第 8 步进行第二次 DNA Wash Buffer 洗涤；
10. 弃去滤液，把 HiBind® DNA Mini Column 重新装回收集管，最大速度离心空柱 2min 以甩干结合柱基质；
11. 把 HiBind® DNA Mini Column 装在干净的 1.5mL 离心管上，加入 30-100 μL Elution Buffer 到结合柱基质中，静置 1min，13,000xg 离心 1min 洗脱出 DNA；  
# 注意：首次洗脱可获得 65-80% 的质粒 DNA，可按照实际需求进行二次洗脱。
  - 用新的 Elution Buffer 进行二次洗脱（可增加产量，但会导致浓度降低）
  - 将第一次洗脱出的 Elution Buffer 重新加至结合柱内进行二次洗脱（可增加洗脱浓度但不增加洗脱体积）。
12. 洗脱的 DNA 保存在 -20°C。

7.15 扩大培养, Ni 柱纯化.

条带 32kDa 左右 包涵体也有  
200mM 咪唑洗脱最佳.

7.16 设计定点突变引物



3000 bp

检测酶活

定点突变

7.17 反应体系: 50ul

5xps buffer 10ul

酶粒 (50ng/ul) 2ul

primer I (100ng/ul) 1.25ul

primer II (100ng/ul) 1.25ul

dNTP mix 4ul

primer star 0.5ul

ddH<sub>2</sub>O 31ul

PCR 程序

95°C 5min

95°C 30s

$T_m - 5$   
~~59°C~~

30s

18x

72°C

1kb-1min

(5724 + 930)

1ul DPN1 37°C 30min

3倍体积 95% 无水乙醇 +

1/3 体积 NaAc 17ul -20°C

醇沉 1h

退火温度:  $T_m - 5 = 68 - 5 = 63^\circ\text{C}$  (需要再次确认)

(有时间可能需要申请实验中心公共平台)

5月19日

桑雨晴 赵明扬

感受态转化, 摇2h, 涂布, 预计明天(5.20)挑单克隆, 晚上送检

5月20日

长菌，挑菌送测

5月21日

桑雨晴

饱和定点（172）突变pcr

转化，涂板

5月26日

桑雨晴

1.挑单菌落，测序

2.配置液体培养基（方便对之前挑的菌进行接种培养）

5月27日

刘诚玉

1.接种液体培养基，将试管缓慢放平，接种于培养基内

5 $\mu$ L氨苄（千分之一）+ 50 $\mu$ L菌液（百分之一）

菌种(pyAly点突变):

1).K172G

2).K172D

3).R143P

4).K172C

5).K172Y

6).K172P

7).R143G

8).R143S

2.接种后在试管上标记，摇床上培养，扩培（37度）

检测菌液浓度：600nm吸光度-培养基空白对照

k172d, k172g（培养失败）还剩六个

iptg诱导：120微/300ml（一升/400微升iptg（iptg本身为500mM））

16度摇床培养诱导（190r 18h）

5月28日



桑雨晴

12:10收菌

- 1.将菌液转移至大塑料离心瓶中，在瓶身上标记，用dd水两两配平。
- 2.大离心机3000r，30min离心（开离心机盖子直接从侧面掰开盖子就行）。
- 3.（12:53）离心后，弃去上清液。

试剂：缓冲液（20mM Tris-HCl;200mM NaOH;pH=7.5）

- 4.用缓冲液重悬菌，并配平，用50mL离心管承装并离心（8000r，20min）。

5月29日

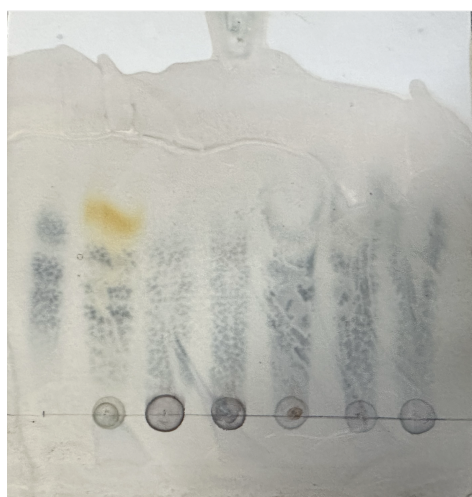
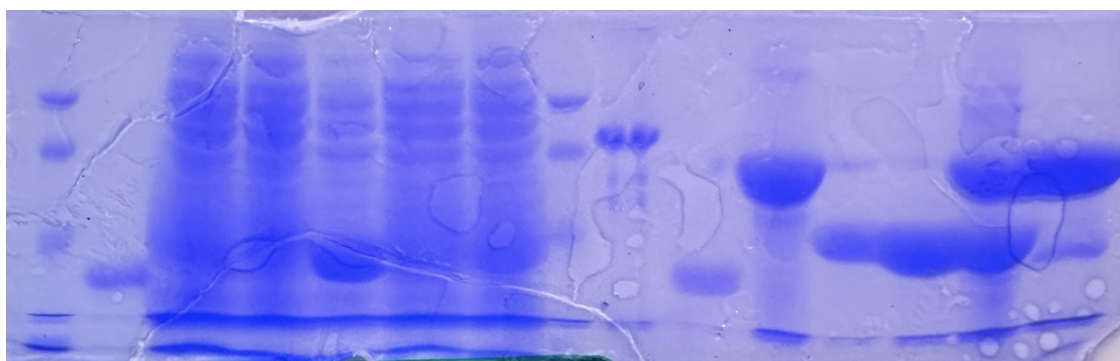
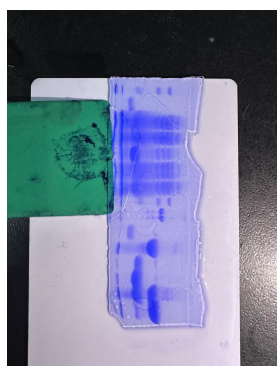
桑雨晴 张松奕 冯竞逸

上午：第一轮菌液超声裂解，配新培养基，

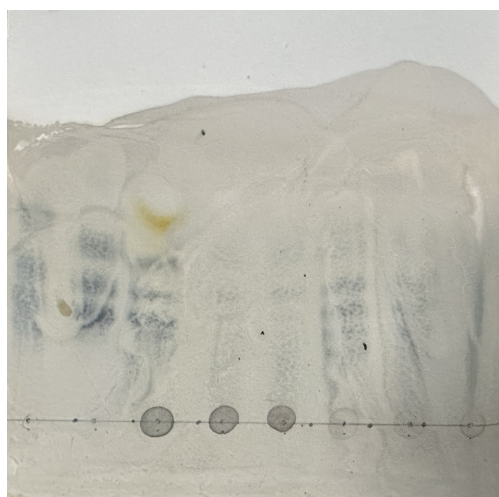
下午：第一轮菌体超声破碎，离心，蛋白SDS-PAGE，产物纸层析；

新一轮接种菌体，扩培，+IPTG

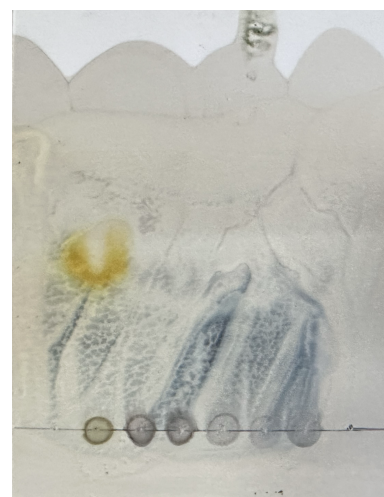
第一轮菌体实验结果（下午）



第一遍纸层析



第二遍纸层析(上2---3---4下)



第三遍纸层析





三次纸层析合并的图，左1-右3，板左侧第一列为Maker

第一、二遍是纯化之前的，TLC板上左边第一列Maker，最右边五个样品代表点左到右突变型(K172P)(R143P)(R143G)(R143S)(K172C)。

前两个[(K172P)(R143P)]点样处痕迹很重，说明酶活性低，基本没有切割。

后三个[(R143G)(R143S)(K172C)]点样处痕迹较轻，证明有切割，但条带不清楚，不能直接说明四糖含量变多。

第三遍做了纯化（金属浴+离心），实验失败，原因可能是展开液问题。

师兄说有可能是因为蛋白不在上清中表达而是表达在内涵体中了，解决办法是可以考虑换一个载体。

但是目前只做了这五个突变，也有可能就是因为恰好这几个突变导致酶活不好，所以先不着急换载体，再多做几个看一看。



从左到右分别为（看不清）|(MARKER)（师兄的样品）(K172P)(R143P)(R143G)(R143S)(K172C)

展开剂:正丁醇:甲酸:水=4:6:1；异丙醇：水：氨水=60:30:4

显色剂（大毒品混合物）：1 二苯胺:2g；2 苯胺:2mL；3 丙酮:100m；4 磷酸:10mL；5 浓盐酸:1mL

5月30日

张松奕

5.29的菌都收完了，有一个没长出来，然后都冻到-80去了，这次离心离出来好像比较少，然后周围有一圈黑黑的

6月3日

赵明扬 张松奕 刘诚玉

（洗试管）配置培养基

液体培养基：

蛋白胨1g，NaCl 1g，酵母粉0.5g，（琼脂1.5g），加水100mL

每个中号烧瓶300ml液体培养基，试管中5ml液体培养基

19:45（培养基高压灭菌后）

接种5微升氨苄，30微升菌（原本是千分之一和百分之一的抗性和菌液，因为菌液不够所以缩减菌液）

菌种（本次共接种八个试管）：

o: K172D

K172G(死)

o: K172Y

o: K172Q

o: R143W

o: R143Y

o: R143A

o: pyaly

170r试管斜插于摇床（靠上一排，最左边两个按钮调转速，最右边是启停）摇床培养。

注意氨苄青霉素要放到-20，而菌种则在-80（pyaly和突变菌不在一起），分开放。

## 6月4日

师兄帮我们做了pcr

## 6月5日

刘诚玉 冯竞逸 张松奕 曹议之 南以雅

### 1. 收菌

K172：第二批A S T W，第三批D（长得很少）Y Q G（菌死子）

R143：第二批L D M，第三批W Y A

### 2. 超声

# 超声

借冰 (二楼 222 造冰机 说 01 实验室)

在量杯里面放入冰和水 (冰水混合物 0度)

离心管放入 (垂直)

加入 25ml 的缓冲液, 菌体重悬 (黑色棍绞一绞, 一定要完全重悬) (没有混悬仪)

固定 (有一个洞的海绵垫)

仪器: 擦一下探头, 探头插到距离底部 1cm 的位置。

点击: 确定 开始

超声好之后放在冰里

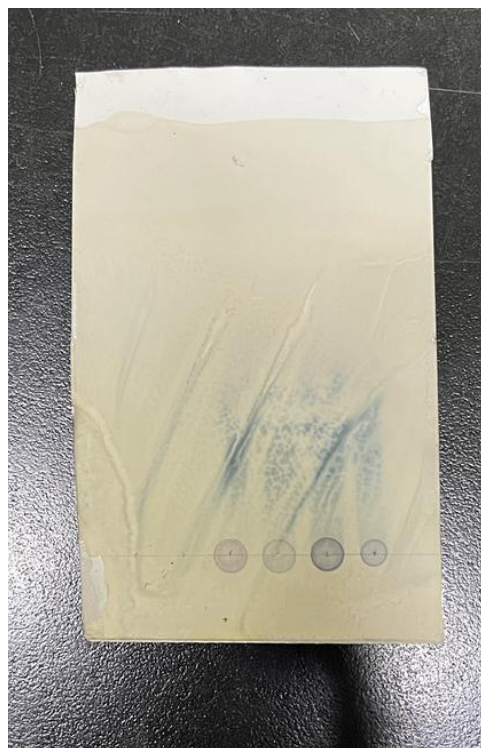
## 3. 酶解TLC纸层析测产物分布

- TLC点样量实际6 $\mu$ L



TLC样品: 蓝笔的是第一批, 黑笔是第二批

第一次层析: 第一个板样品: 左到右 K172A, K172S, R143L, R143D (实际酶解时间长于1h)



第一次层析: 第一个板样品: 左到右 K172A, K172S, R143L, R143D (实际酶解时间长于1h)



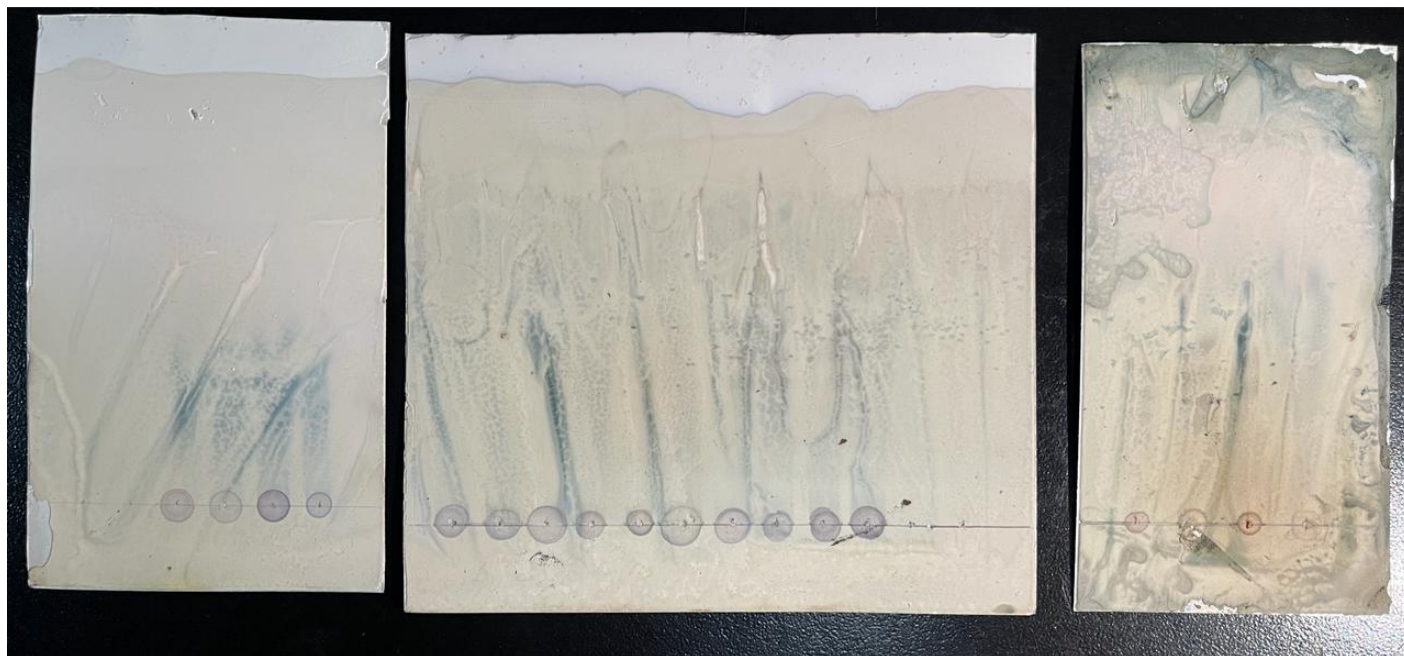
重复 (左到右) K172A, K172S, R143L, R143D



第二次层析：第二个板样品：PyAly, K172D, K172Q, K172T, K172Y, K172W, R143A, R143M, R143Y, R143W

第三次层析：第一个板样品：左到右K172A, K172S, R143L, R143D（实际酶解时间长于1h）

第三次纸层析



三次纸层析（左第一次-右第三次）

第一次结果：要换展开剂，酶解时间不够，展开时间不够（这组酶解1h，展开35min）

综合：酶解时间不够，酶活性比较低要加大酶量，要换新的展开剂和染色液

#### 4. SDS-PAGE

10个样品

5 $\mu$ L buffer+20 $\mu$ L样品,加热5min,上样

kDa      1      2      3      4      5      6      7      8      9      10      11

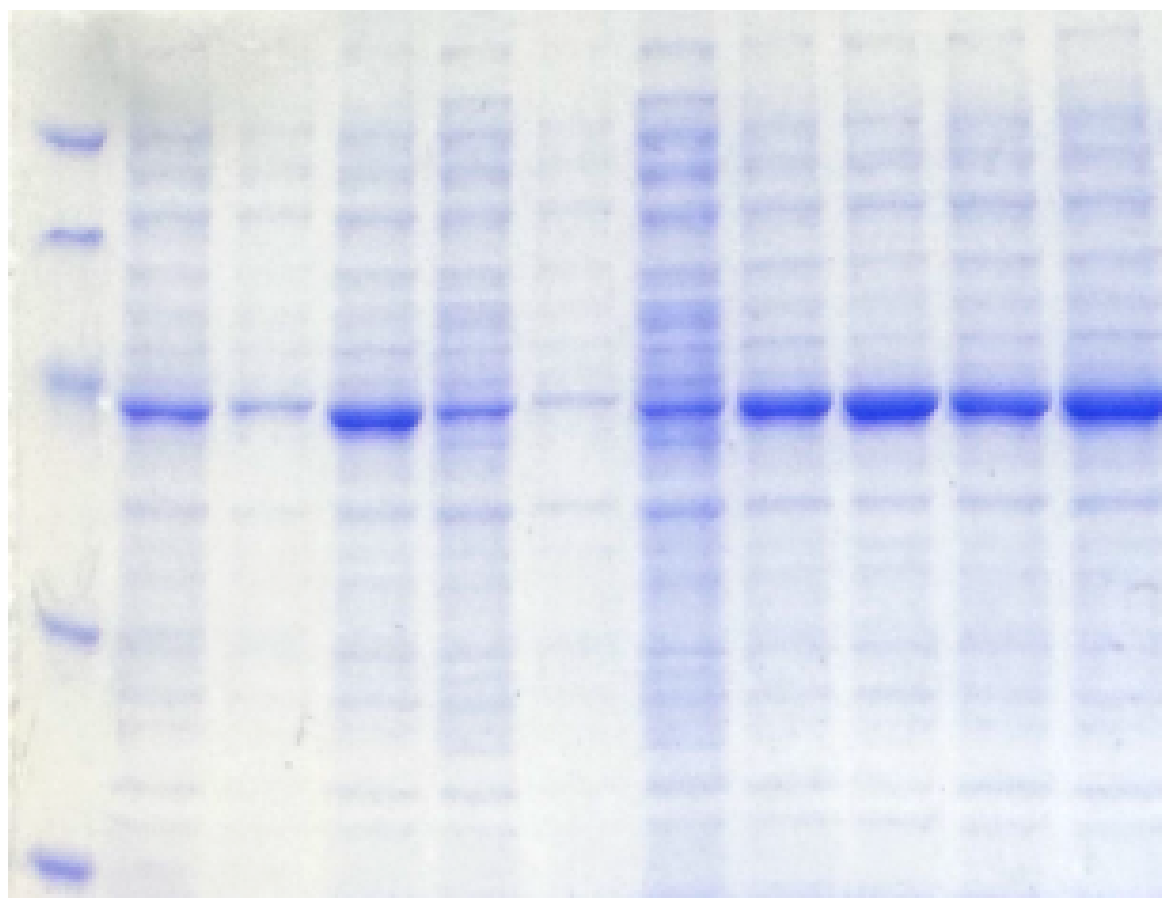
97.3

66.4

44.3

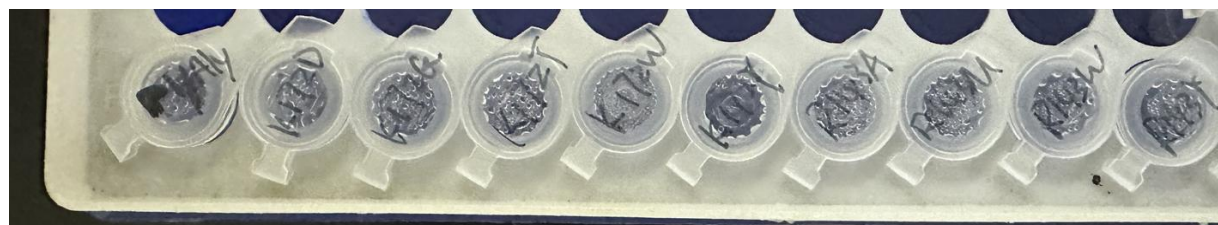
29.1

20.0



1、Marker      2、PyAly      3、K172D      4、K172Q  
5、K172T      6、K172W      7、K172Y      8、R143A  
9、R143M      10、R143W      11、R143Y

 20250605 OUC\_DE SDS-PAGE(10).pptx



电泳孔道左至右顺序：maker, PyAly, K172D, K172Q, K172T, K172W, K172Y, R143A, R143M, R143W, R143Y, maker, 两个师兄的样品

| Results |       |         |     |     |
|---------|-------|---------|-----|-----|
| Area    | Mean  | Min     | Max |     |
| 1       | 22140 | 135.317 | 91  | 184 |
| 2       | 21420 | 133.486 | 91  | 173 |
| 3       | 21420 | 159.362 | 129 | 178 |
| 4       | 21420 | 117.866 | 72  | 173 |
| 5       | 21420 | 139.947 | 103 | 178 |
| 6       | 21420 | 164.194 | 142 | 179 |
| 7       | 21420 | 127.201 | 87  | 174 |
| 8       | 21420 | 117.920 | 75  | 168 |
| 9       | 21420 | 110.595 | 66  | 170 |
| 10      | 21420 | 116.132 | 75  | 166 |
| 11      | 21420 | 100.999 | 64  | 156 |
| 12      | 21420 | 171.183 | 161 | 178 |

使用imagej  
计算得到样品  
灰度

电泳孔道左至右顺序：maker, PyAly, K172D, K172Q, K172T, K172W, K172Y, R143A, R143M, R143W, R143Y, maker, 两个师兄的样品



未电泳样品：K172A, K172S, R143L, R143D

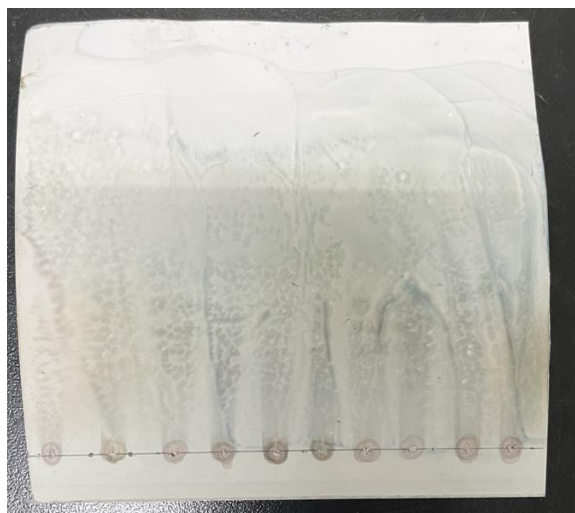
6月6日

桑雨晴 刘诚玉 张松奕

### 1. TLC——新的展开剂和染色剂

- 第一次TLC：昨天第二次TLC的样品做的（重复了一次），展开35min

左至右：PyAly, K172D, K172Q, K172T, K172Y, K172W, R143A, R143M, R143W, R143Y,



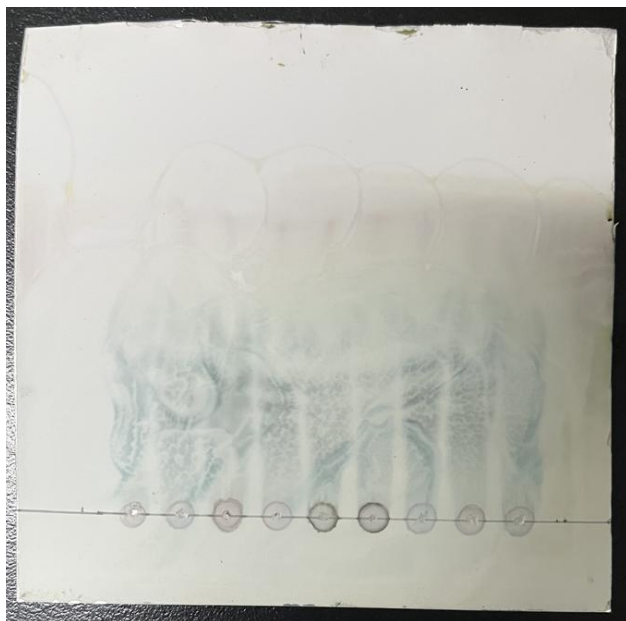
左至右：PyAly, K172D, K172Q, K172T, K172Y,  
K172W, R143A, R143M, R143W, R143Y,

- 第二次TLC：

K172C, K172P, R143G, R143S, R143P从留样的EP管中取样（第二轮）

10 $\mu$ L酶+90 $\mu$ L底物，酶解55min，展开35min

K172A, K172S, R143L, R143D：用的昨天第一个板的样品（重复昨天第一个板的实验）



左至右: K172A, K172S, R143L,  
R143D, K172C, K172P, R143G, R143S, R143P,  
(K172C, K172P, R143G, R143S, R143P (第二  
轮) )

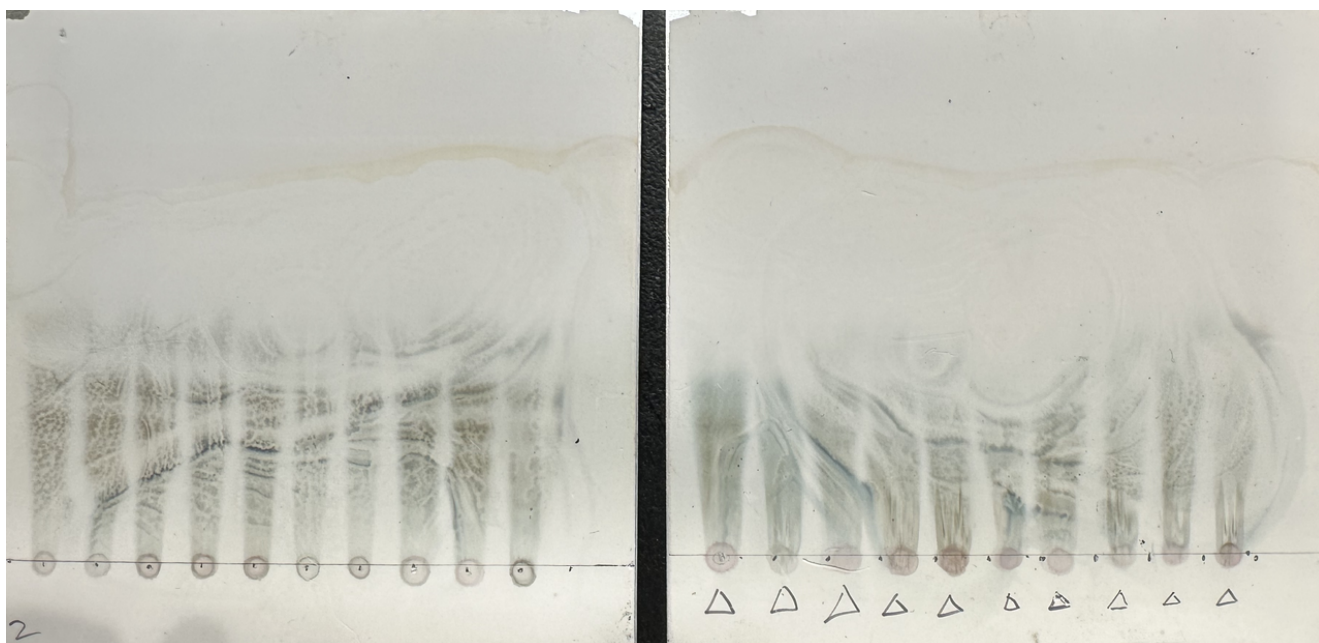
- 第三次: 过滤0.22 $\mu$ m后TLC

PyAly, R143G, R143L, K172A, K172S

6月7日

张松奕 赵明扬 程凯蓉 刘诚玉

昨天结果不理想, 用昨天的样品, 重复实验



1 (右图)、从左到右: PyAly K172D K172Q K172T K172Y K172A K172S K172W K172C K172P;  
2 (左图)、PyAly R143M R143W R143Y R143A R143G R143L R143S R143D R143P

1. (172突变型)

2 (143突变型) 见明显条带，可能因染色剂冲刷不当导致条带偏移

## 6月8日

90微升polyM(后续加了糖浓度偏高)+酶量 (微升)：如下

R143Y 5

R143L 5.5

R143S 5.2

R143M 5

R143P 5

R143A 6

R143W 5.1

R143g 5.0

R143d 5.1

Pyaly

K172d 5.4

K172q 6.0

K172t 5.6

K172w 7

K172Y 6.9

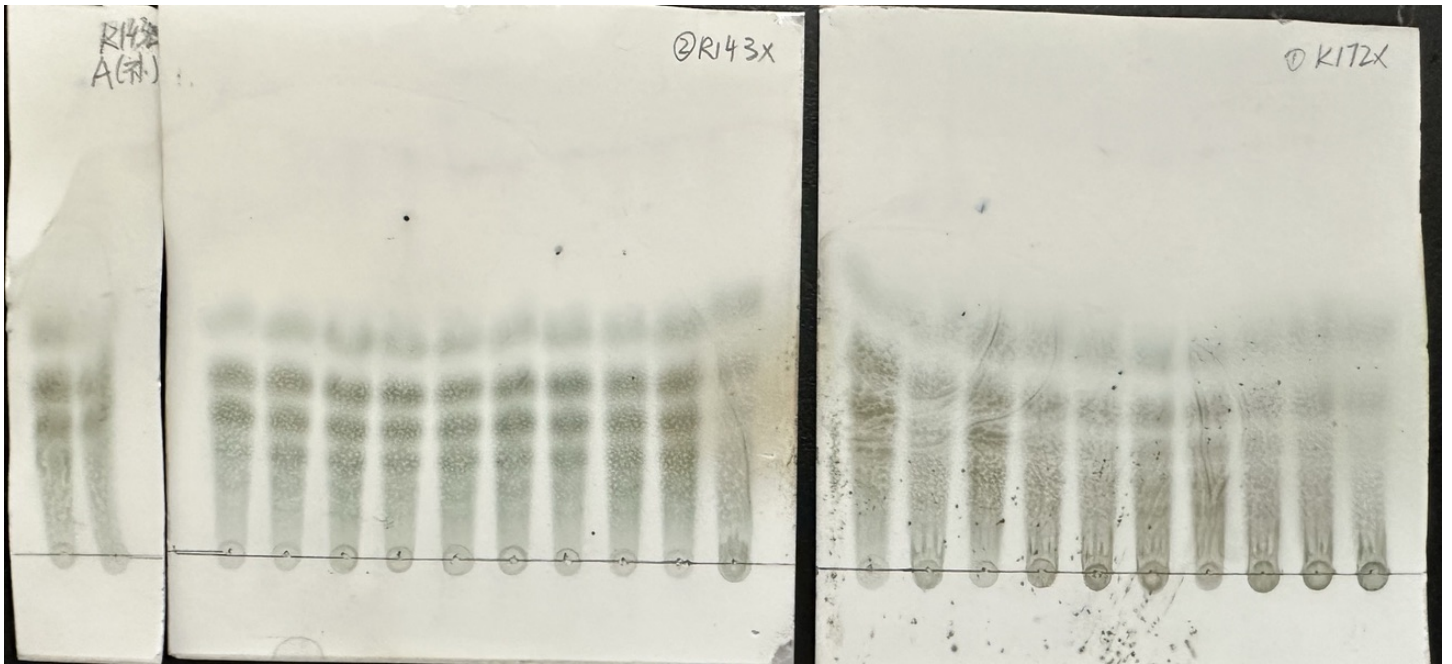
K172s 5.1

K172p 8

K172c 7.7

K172A 5.4

12:39-14:57共酶解2h18min (其实是操作失误)



20250605 OUC\_DE May&June.pptx

14.91MB



## 7.4

接种:K172 MFEHILR

## 7.5

诱导扩培: K172 MFEHILR

K172F 疑似没长出来, 最后加时间后长出来了

## 7.6

收菌: K172 MFEHILR

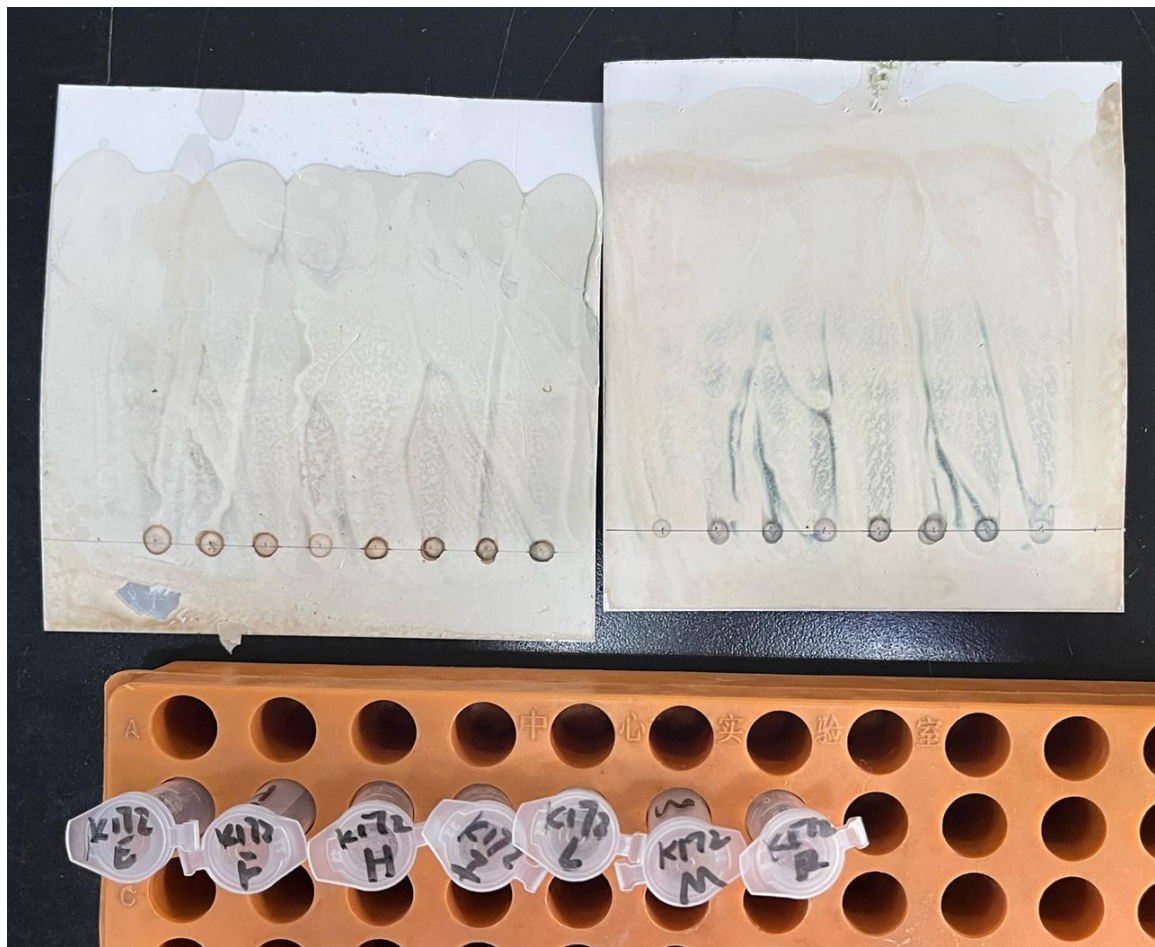
全部冻-80等到下周三做

## 7.9

- K172 MFEHILR

1. 超声破碎:K172E 超声前没有擦探头, 这个的前一个是K172R
2. TLC :45 $\mu$ L polyM +5 $\mu$ L上清, 反应1h, 金属浴, 离心, 点样, 展开, 第一次35min, 第二次45min (换新的展开剂)

结论: 着色剂有问题, 明天配新的重新跑



左侧为第一次层析，右侧第二次层析

点样顺序：第一个废孔，K172E, K172F, K172H, K172I, K172L, K172M, K172R

- R143 H C K T V Q F

1. 接种

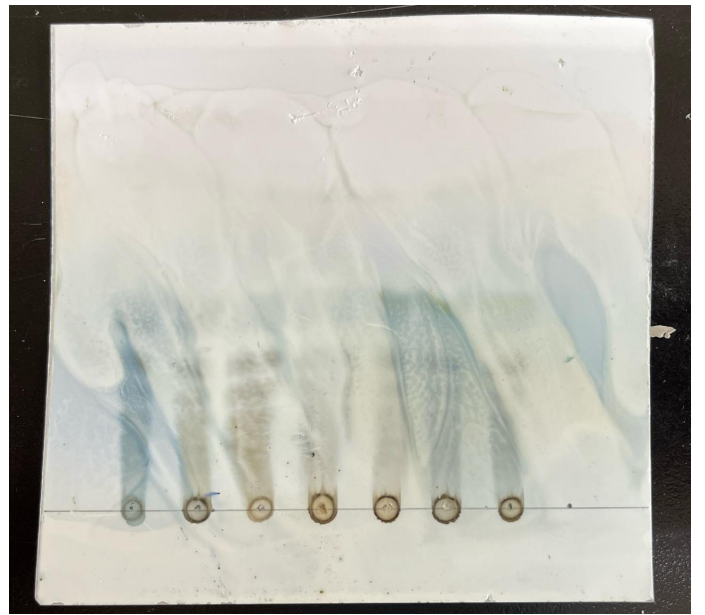
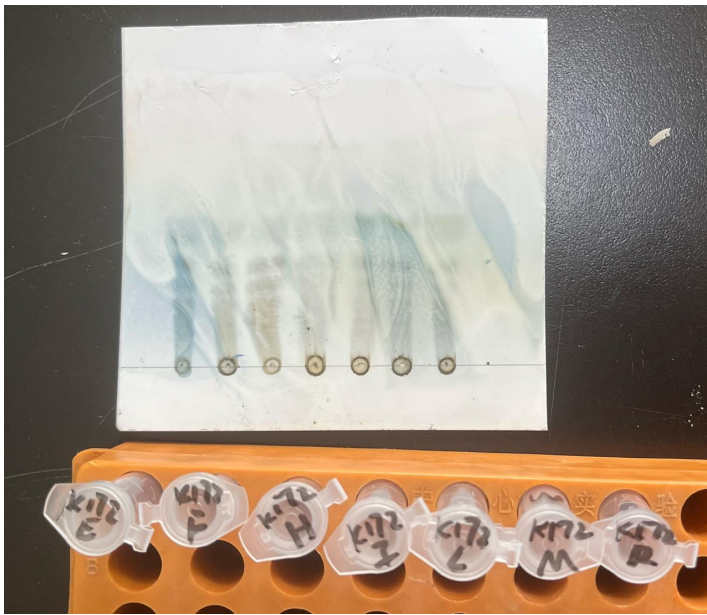
2. 扩培：培养2.5h，Q最好，V F H K较好，T C较稀（能透过字），培养至3.5h所有菌生长情况接近，加IPTG诱导

## 7.10

- K172 M F E H I L R

1. 取昨天反应液，用新的显色剂跑TLC，结论:反应不充分，需要重跑反应，其中K172E, K172H 反应比较充分



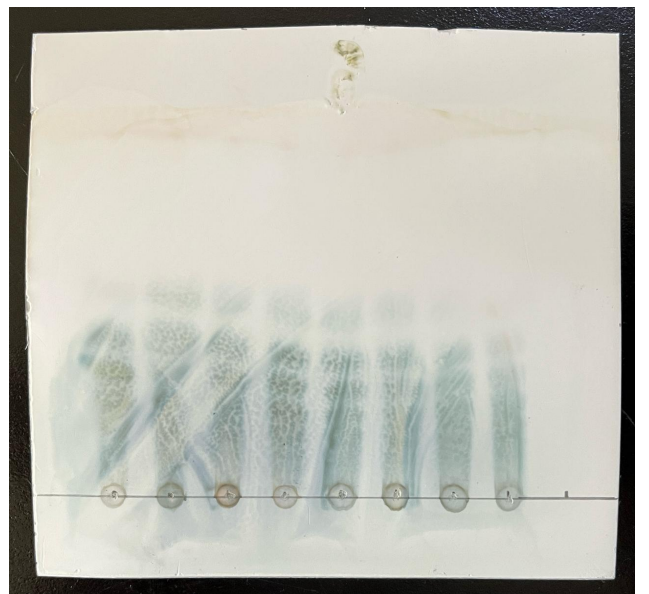
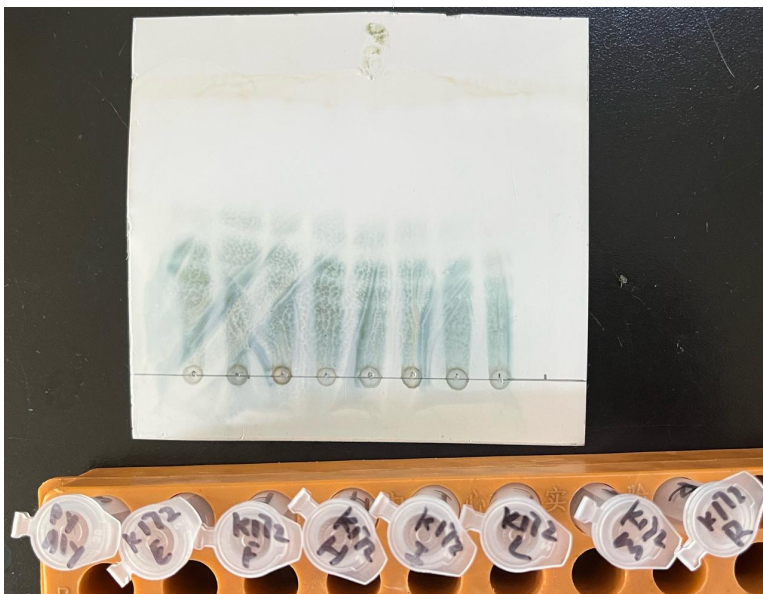


点样顺序：K172E, K172F, K172H, K172I, K172L, K172M, K172R

## 2. 取PyAly, K172 E F H I L M R 跑TLC

其中polyM 45 $\mu$ L。PyAly, K172E, K172H用5 $\mu$ L, 反应1.5h。其他酶的加6 $\mu$ L并反应2h。

点样6 $\mu$ L



点样顺序：PyAly, K172E, K172F, K172H, K172I, K172L, K172M, K172R

- R143 H C K T V Q F

## 1. 收菌，一切正常，冻-80明天超声

7.11

- R143 H C K T V Q F

## 1. 超声破碎，取1ml保种

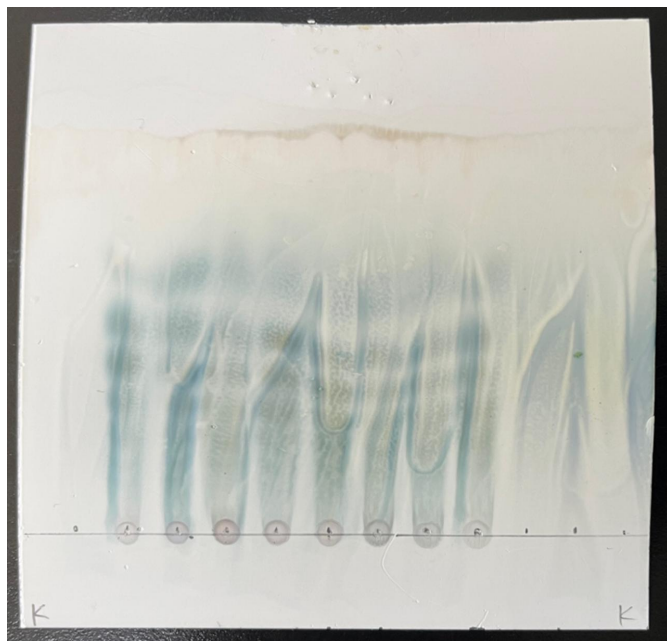
- K172M, F, E, H, I, L, R & R143H, C, K, T, V, Q, F

1. 根据昨天的结果，每个突变体活性不一致，开始调反应时间和酶浓度，使得反应后完全降解（终产物），就是TLC横线上圆圈程度接近。后续实验需要把单点饱和突变所有东西定合适时间和酶量

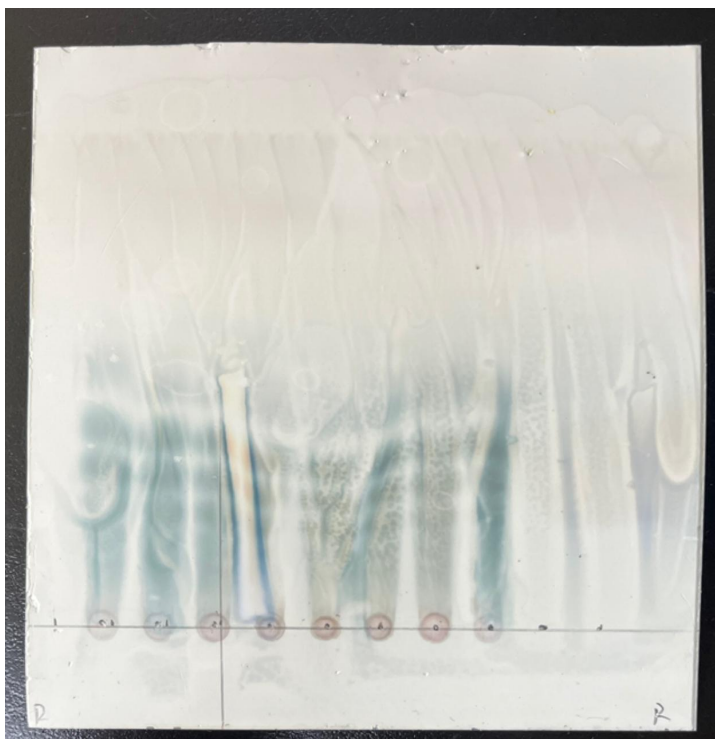
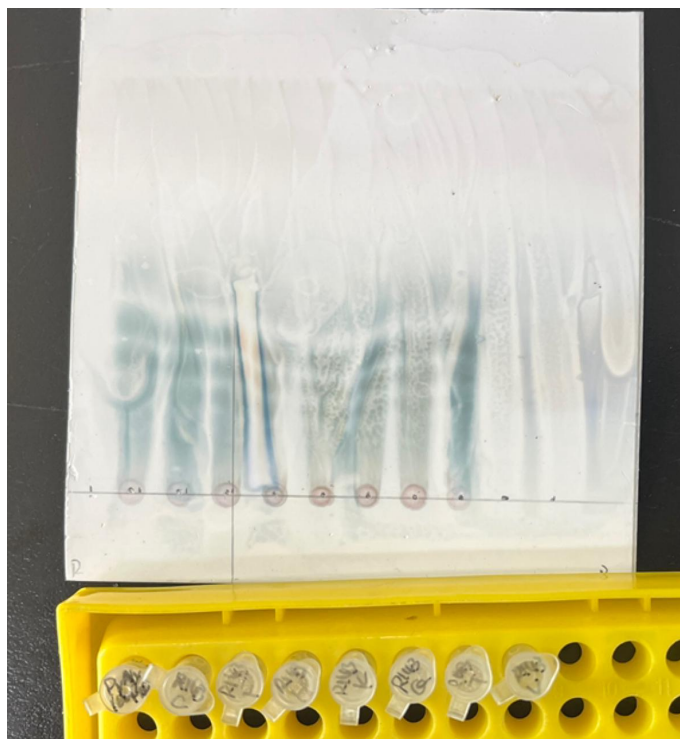
## 2. TLC

14个突变：polyM 40 $\mu$ L，酶10 $\mu$ L，反应2h

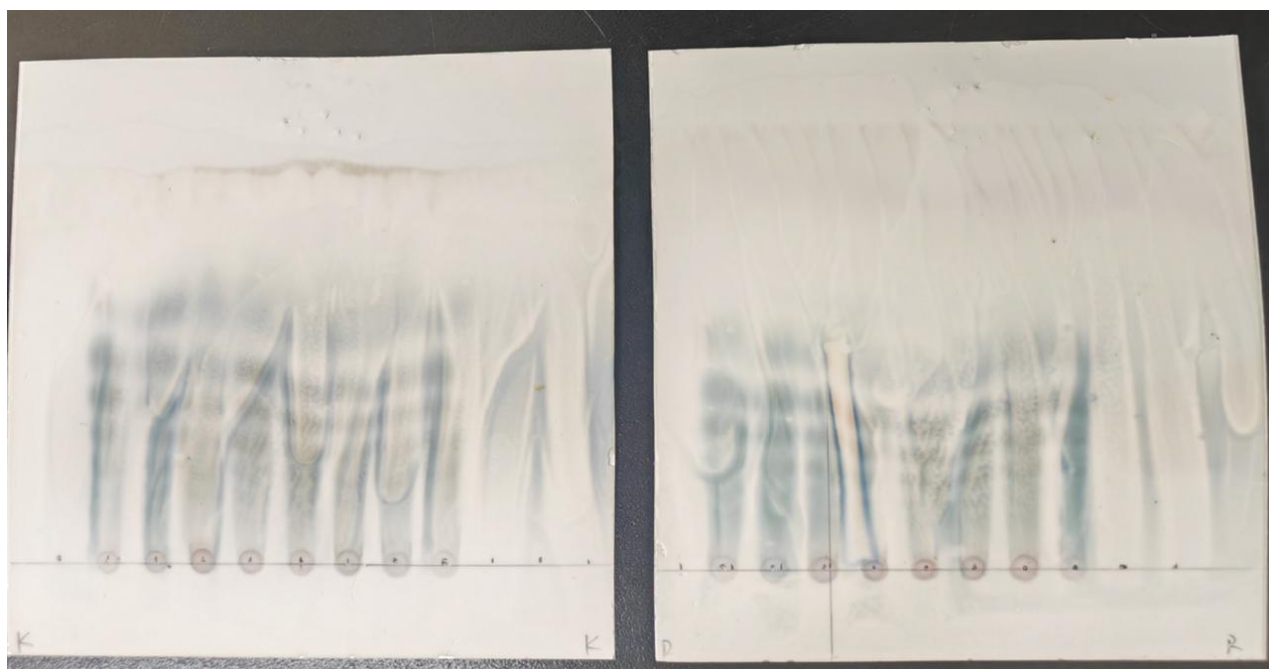
PyAly:polyM 160 $\mu$ L，酶40 $\mu$ L，反应2h。保存当marker用



点样顺序：PyAly, K172E, K172F, K172H, K172I, K172L, K172M, K172R

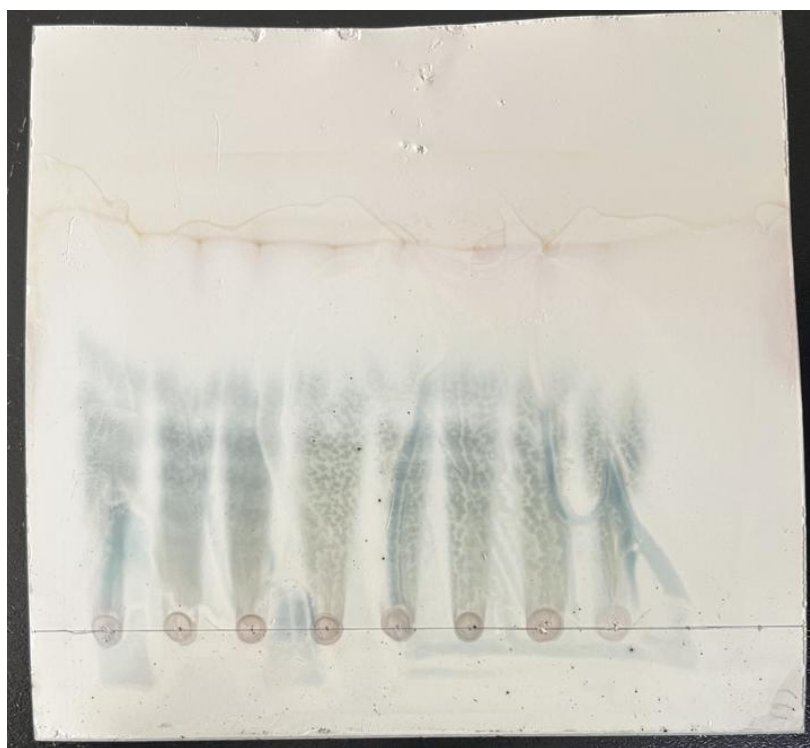


点样顺序：PyAly, R143C, R143F, R143H, R143K, R143Q, R143T, R143V



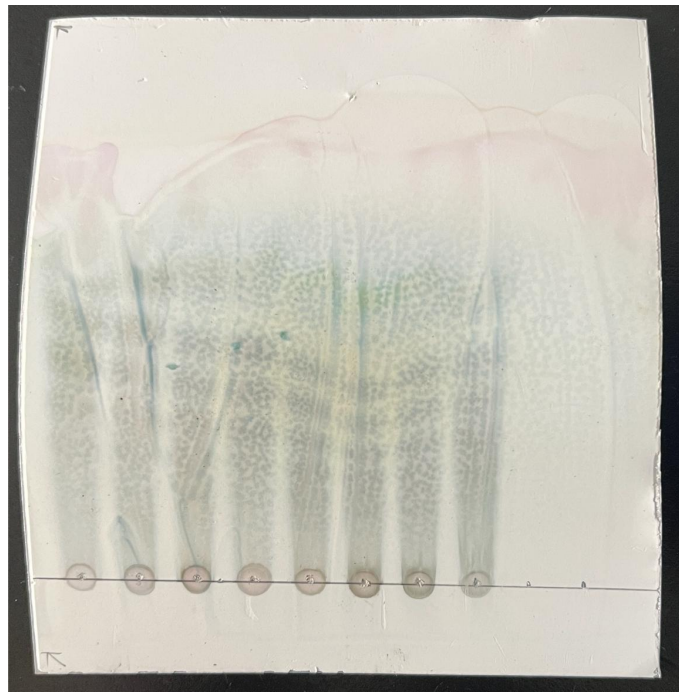
左侧:K 位点突变体, 右侧R位点突变体

### 3. 7.12日: 新配染色剂重跑



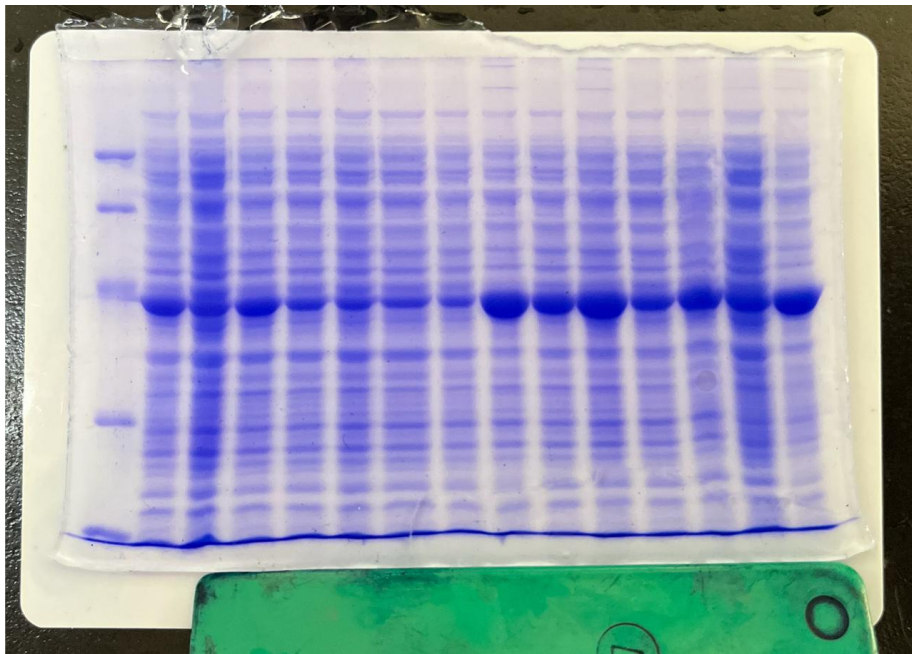
点样顺序: PyAly, R143C, R143F, R143H, R143K, R143Q, R143T, R143V



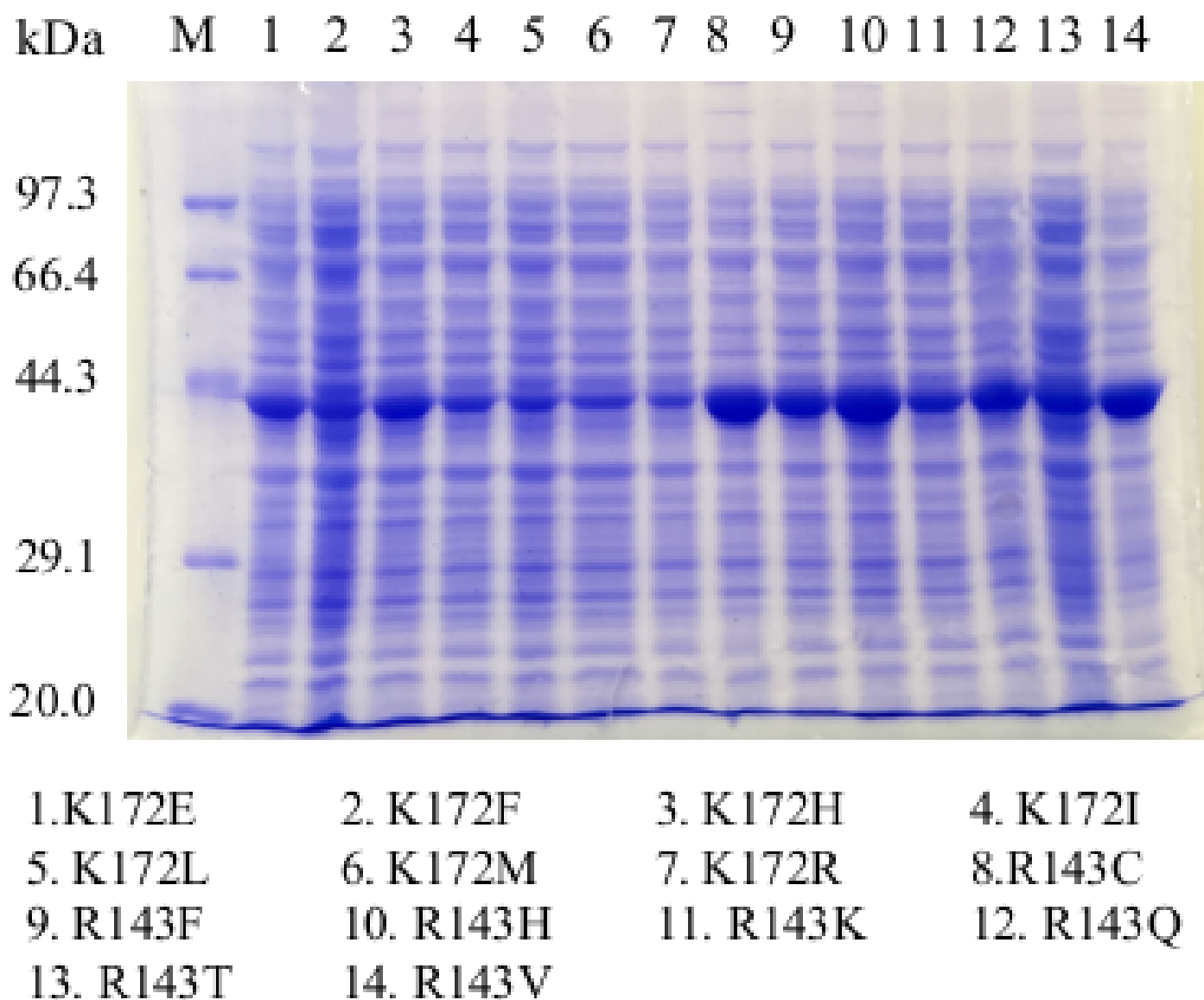


点样顺序：PyAly, K172E, K172F, K172H, K172I, K172L, K172M, K172R

#### 4. 配胶，跑SDS-PAGE，7.12看结果



左至右：Marker, K172E, K172F, K172H, K172I, K172L, K172M, K172R, R143C, R143F, R143H, R143K, R143Q, R143T, R143V



20250712 OUC\_DE July.pptx

## 7.12

把昨天反应完没跑的两个TLC跑两次了（样品反应后放在冰盒里置于4度冰箱），结果在7.11的里面

- R143E I N, K172N V

1. 7.11晚定引物，早上跑PCR
2. 消化1h，醇沉30min
3. 转化，涂板培养

## 7.14



- R143E I N, K172N V

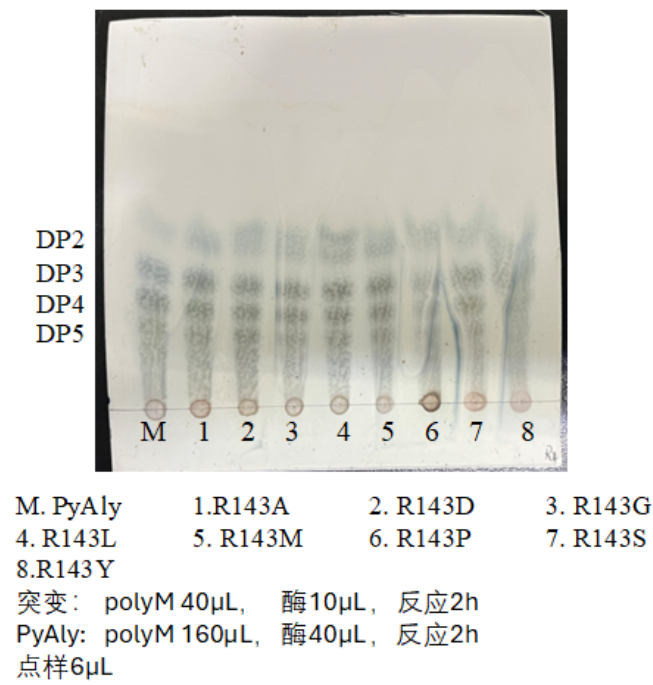
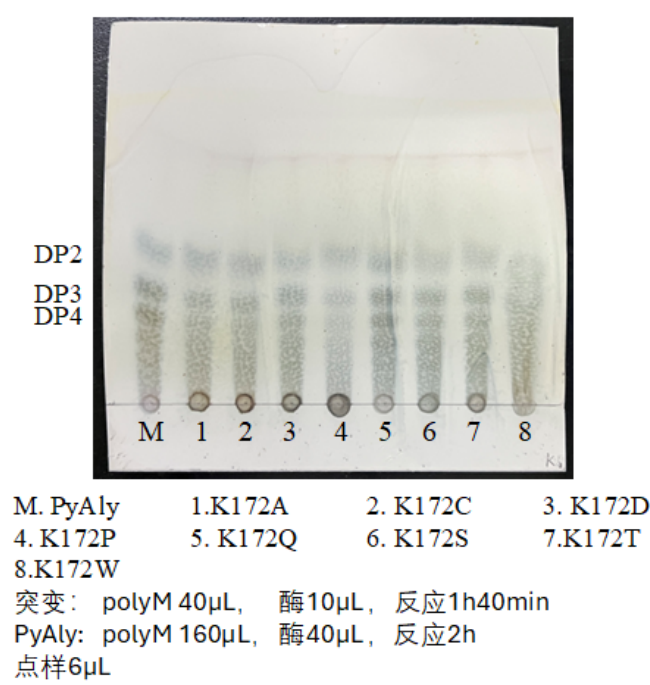
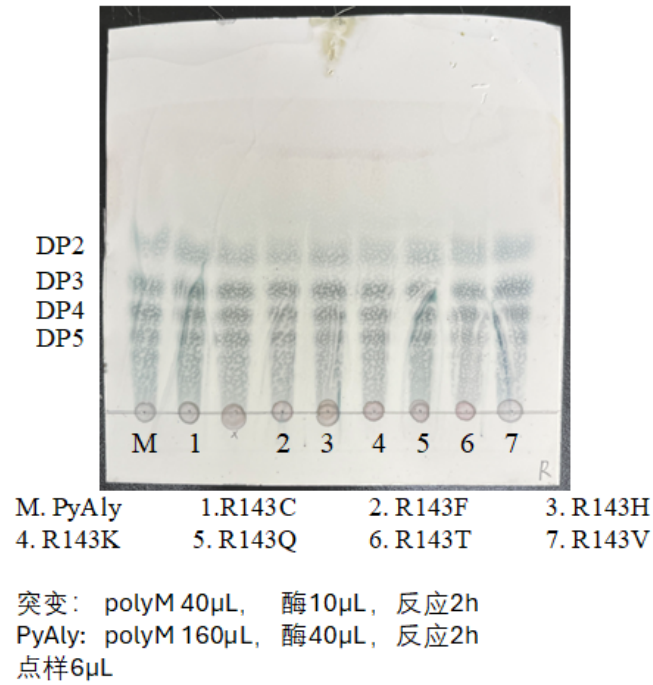
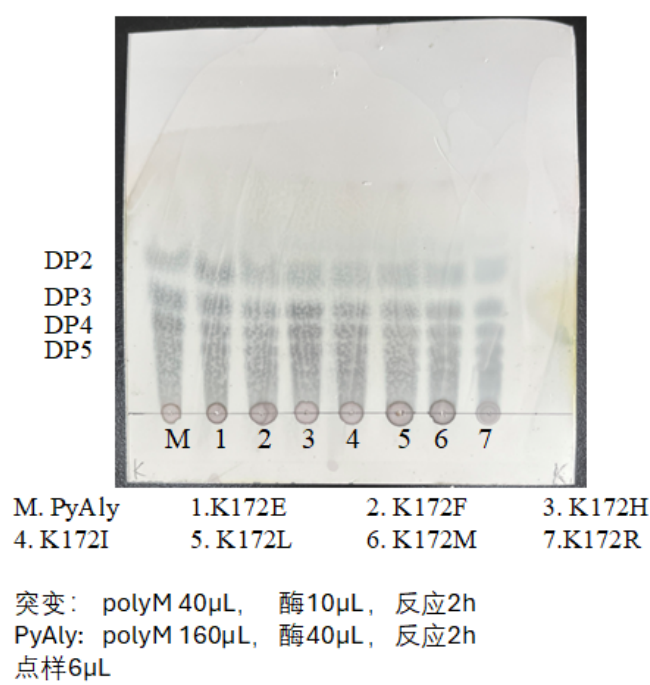
挑单菌落培养，R143E平板没长东西，取样送测序

### 7.15

- R143E I N, K172N V

1. 除R143E外，保种，扩培，诱导
2. R143E 重新pcr消化醇沉转化接种培养

- TLC：层析液换新





左至右：PyAly, K172Y, K172Y, R143W（大失败：染色剂不行了）

结论：层析液与染色剂现配现用，染色时候直接倒染色剂且倒快点

K的明天重做，酶20polyM40,2.5h

提问：为啥四糖产量高的三糖也高，似乎R的突变体效果更好

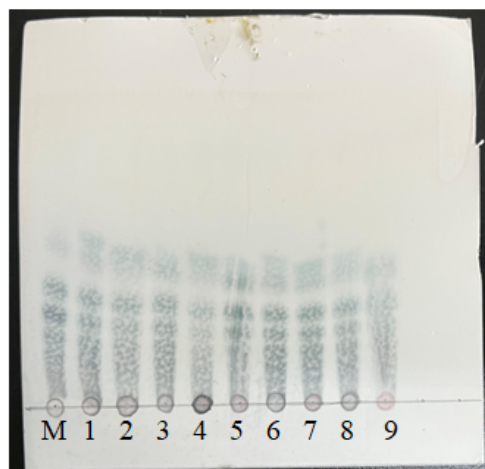
## 7.16

- R143E：挑单克隆，测序，接种扩培（明天去浮山做HPLC，实验室没人没法收菌，只能灭掉，改日重摇）
- R159G,F170Y,F170H,F170V,F170T:F170的突变体给了质粒，转化涂板；R159G给的是菌，改日直接接种
- R143 I N, K172N V：测序结果正常，收菌超声保种
- TLC

重做K172A, K172C, K172D, K172P, K172Q, K172S, K172T, K172W

补做：K172N, K172V, R143I, R143N, R143W

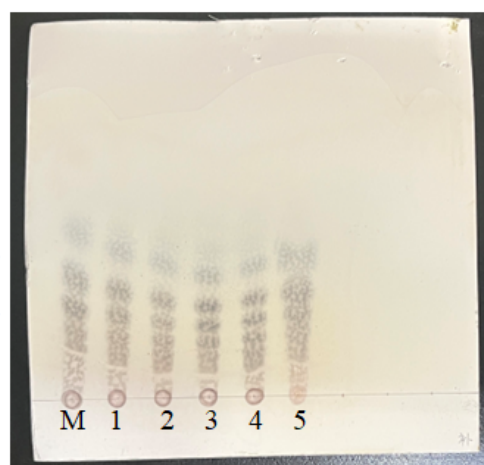
DP2  
DP3  
DP4  
DP5



M. PyAly 1.K172A 2. K172C 3. K172D  
4. K172P 5. K172Q 6. K172S 7.K172T  
8.K172W 9. K172Y

突变: polyM 40μL, 酶20μL, 反应2h  
PyAly: polyM 160μL, 酶40μL, 反应2h  
点样6μL

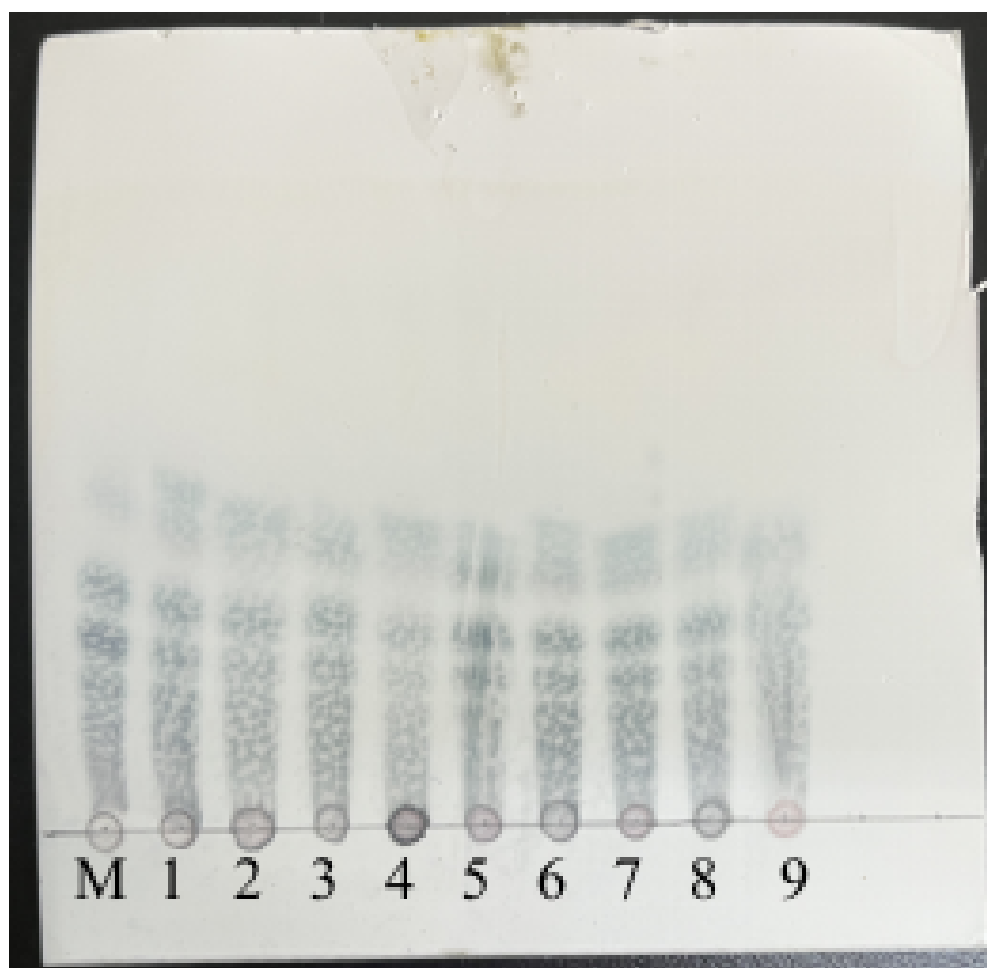
DP2  
DP3  
DP4  
DP5



M. PyAly 1.K172N 2. K172V 3. R143I  
4. R143N 5. R143W

突变: polyM 40μL, K172-20μL,R143-10μL, 反应2h  
PyAly: polyM 160μL, 酶40μL, 反应2h  
点样6μL

DP2  
DP3  
DP4  
DP5



|          |          |          |          |
|----------|----------|----------|----------|
| M. PyAly | 1. K172A | 2. K172C | 3. K172D |
| 4. K172P | 5. K172Q | 6. K172S | 7. K172T |
| 8. K172W | 9. K172Y |          |          |

突变: polyM 40 $\mu$ L, 酶20 $\mu$ L, 反应2h

PyAly: polyM 160 $\mu$ L, 酶40 $\mu$ L, 反应2h

点样6 $\mu$ L

 20250716 OUC\_DE July.pptx

## 7.17

HPLC预实验: 试跑Pyaly和R143

结果: 可能存在色谱柱劣化 (包括污染), (10%甲醇) 醇洗一晚

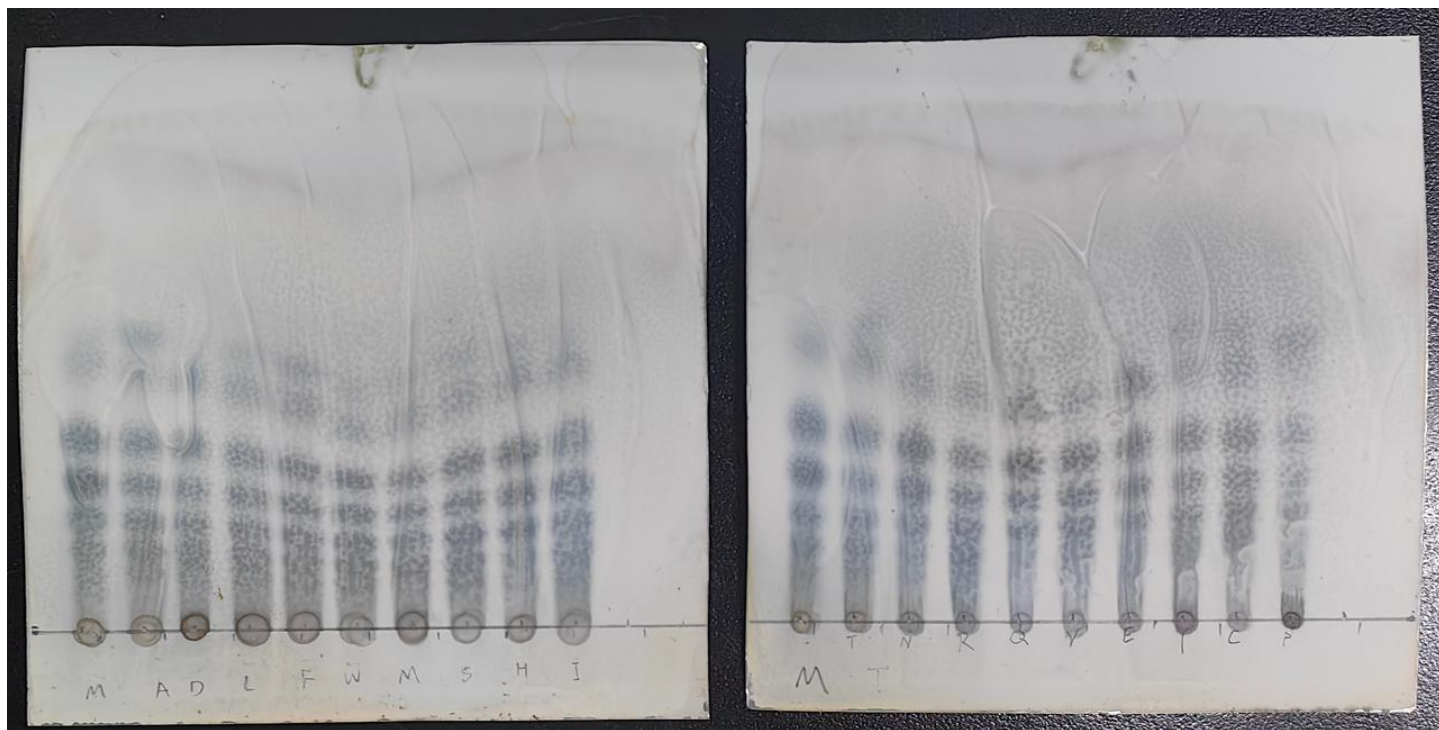
Pyaly未观察到无特征峰

R143A 脱尾和杂峰较严重

## 7.21

1. F170Y F170H F170V F170T: 保种 (在-80的一个标了2的袋子里), 扩培, 正在过夜诱导中 (18h)

2. K172ADLFWMSHITNRQVEYCP: TLC结果如下, 一部分明天进行HPLC



突变: polyM 80 $\mu$ L, 酶 40 $\mu$ L, 反应7.5h

PyAly: polyM 160 $\mu$ L, 酶 40 $\mu$ L, 反应7.5h



20250721.pptx  
10.07MB



## 7.22

1. R143PFMHQITKNGSWCVLDYA: polyM 80 $\mu$ L, 酶 20 $\mu$ L, 反应中

PyAly: polyM 160 $\mu$ L, 酶 40 $\mu$ L, 反应中 (上午11:50开始)

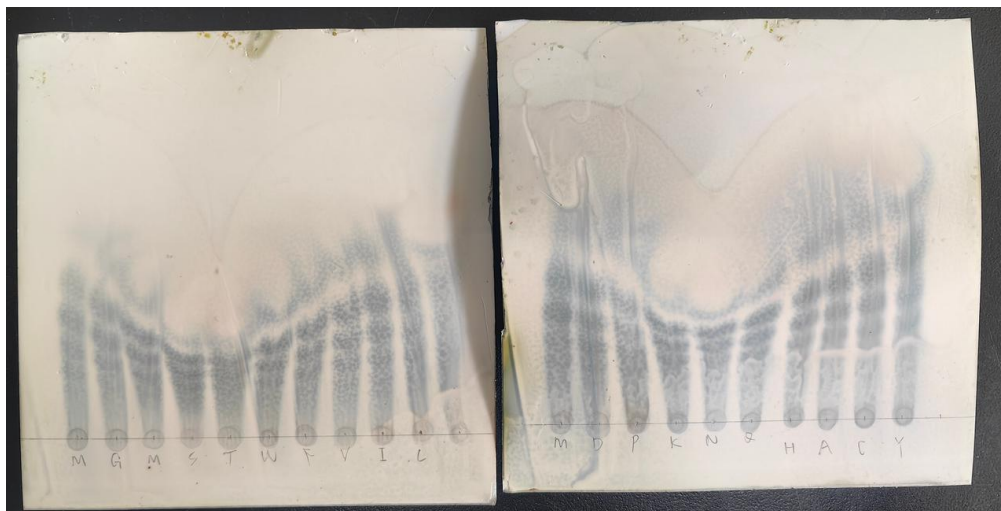
2. F170Y F170H F170V F170T: 收菌, 超声破碎

3. K172ACEFINQRSTV、R143ADGIMP SY: HPLC

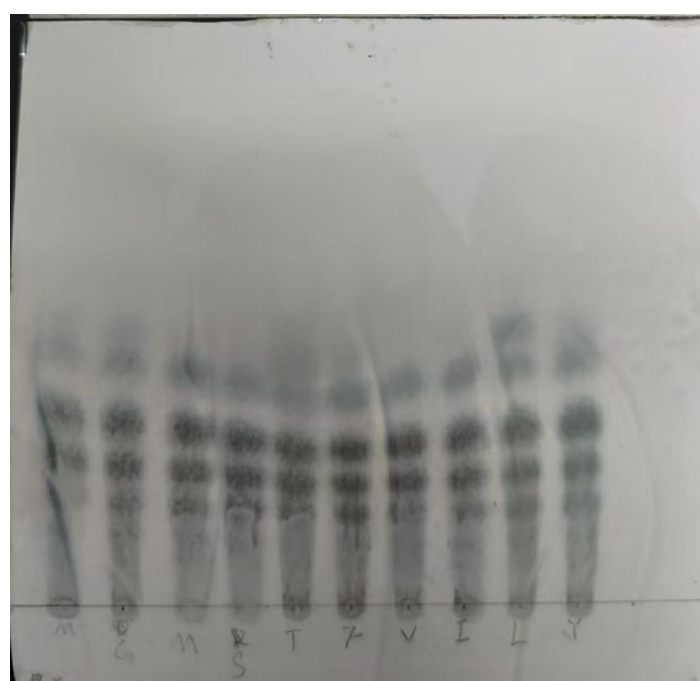
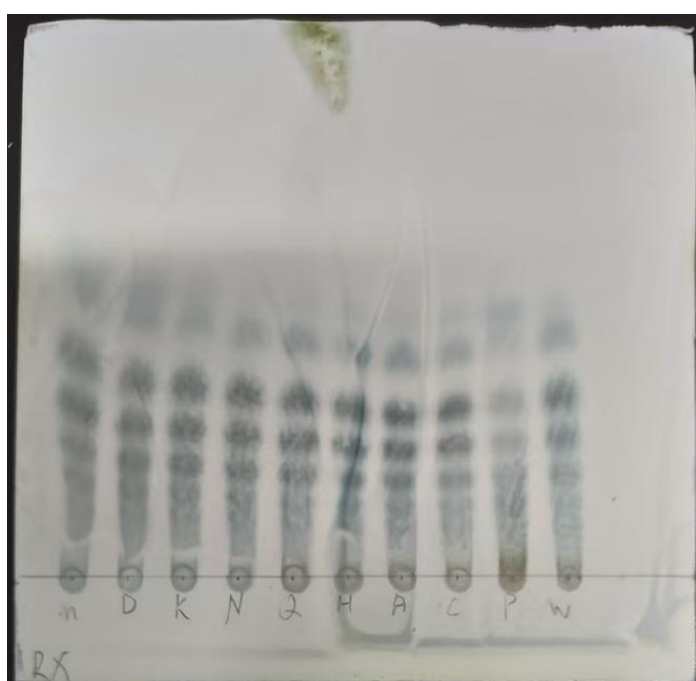
## 7.23

1. R143PFMHQITKNGSWCVLDYA: TLC, 结果如下 (第一个为失败了结果, 第二个为重做的)



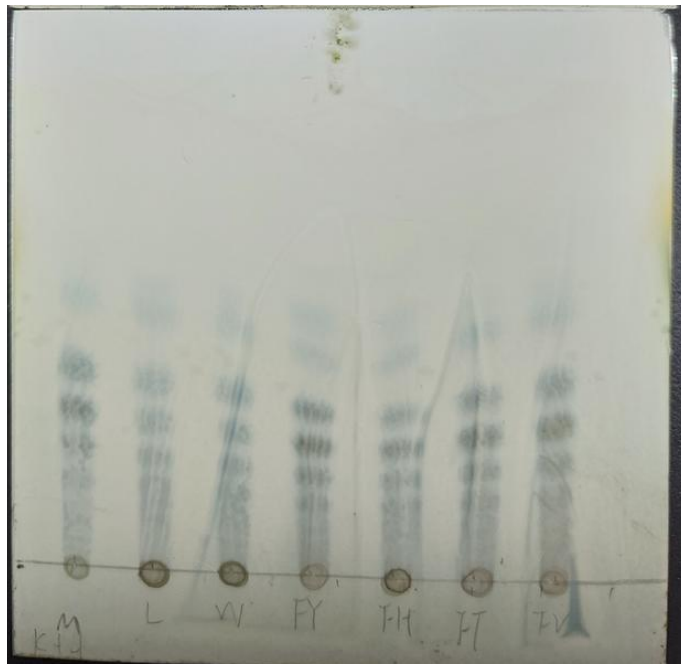
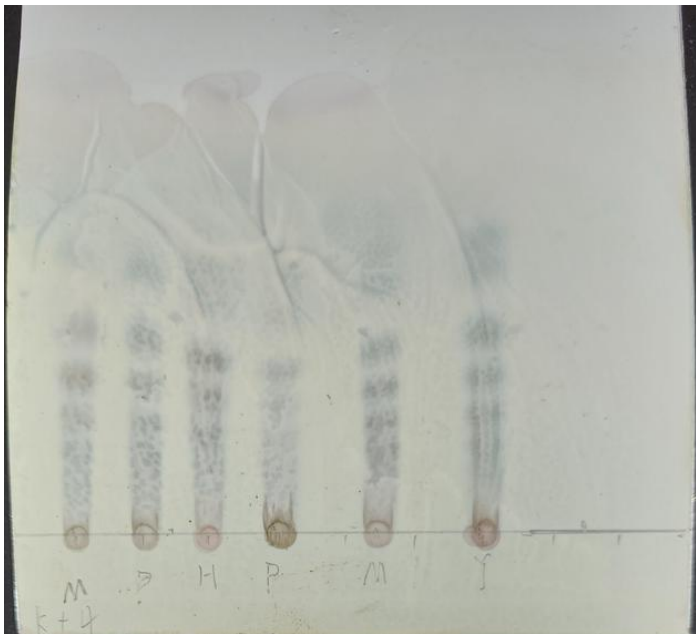


因为板子放下去之后，动了酸缸导致液面晃动，并且还不小心贴壁了，所以很失败！以后放进板子之后就不要再动了！



## 2. K172 D H P M Y L W: 补酶重新TLC

F170 Y H T V: polyM 160 $\mu$ L, 酶 40 $\mu$ L, 反应4h

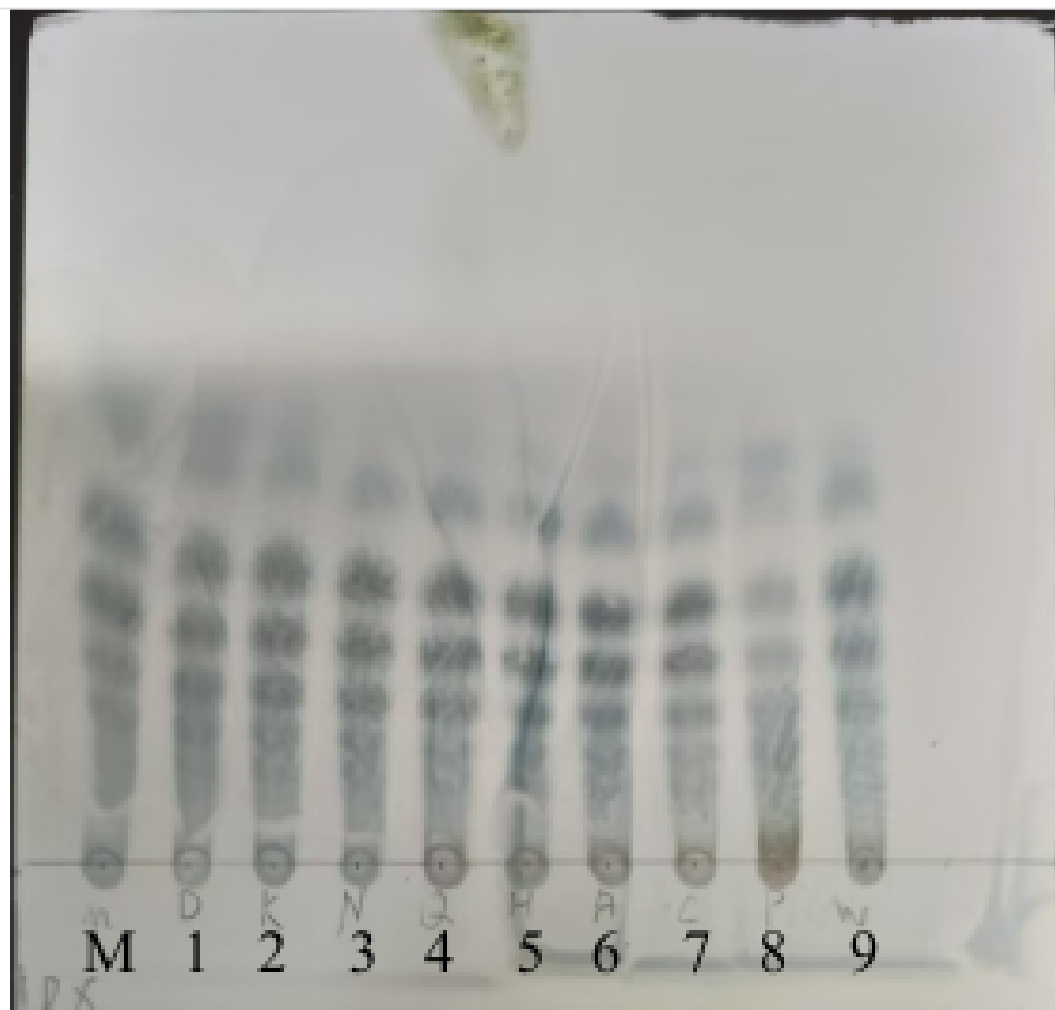


DP2

DP3

DP4

DP5



M. PyAly

1. R143D

2. R143K

3. R143N

4. R143Q

5. R143H

6. R143A

7. R143C

8. R143P

9. R143W

突变: polyM 80 $\mu$ L, 酶 30 $\mu$ L, 反应7.5h

PyAly: polyM 160 $\mu$ L, 酶 40 $\mu$ L, 反应7.5h

点样6 $\mu$ L

 20250723.pptx

## 7.24

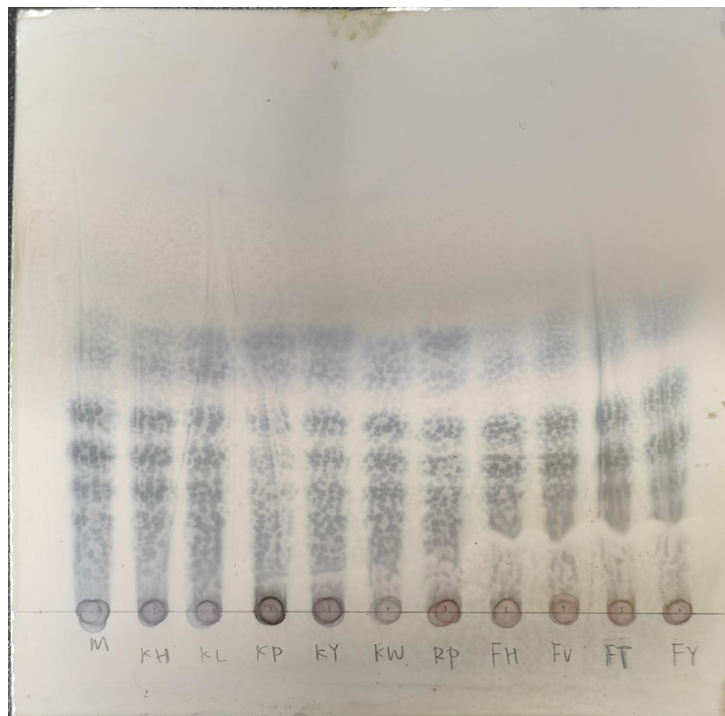
备注: 昨天一些反应完的样品由于在室温下放了太久, 天气热了, 有些发酵了 (?), 以后反应完及时放 4 $^{\circ}$ C!

1. 之前反应不完全的, 重新TLC

K172 P Y L W H: polyM 100 $\mu$ L, 酶 80 $\mu$ L, 反应6h

R143 P: polyM 100 $\mu$ L, 酶 60 $\mu$ L, 反应6h

F170 Y H V T: polyM 120 $\mu$ L, 酶 80 $\mu$ L, 反应6h



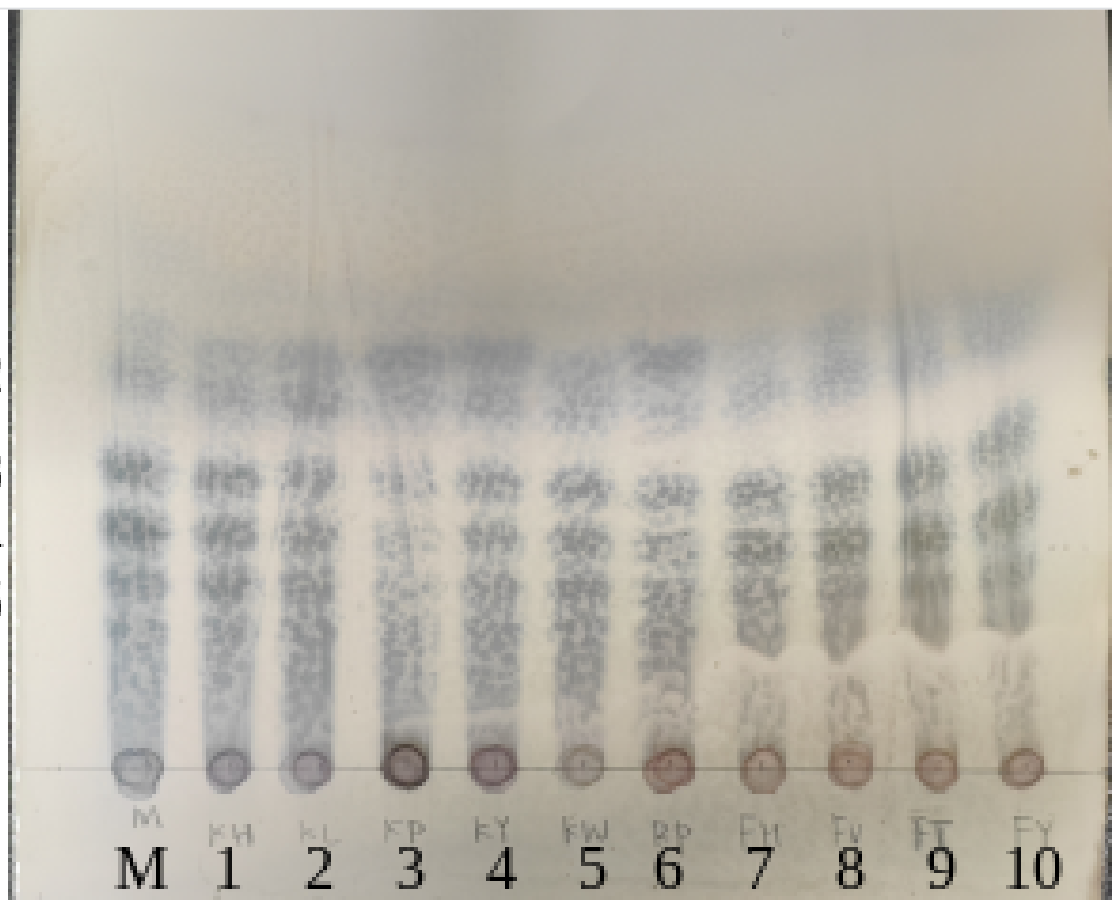
KP、KY还是挺深的，大概说明这两个突变的活性很低很低

DP2

DP3

DP4

DP5



M. PyAly

1.K172H

2. K172L

3. K172P

4. K172Y

5. K172W

6. R43P

7. F170H

8. F170V

9. F170T

10. F170Y

K 突变: polyM 100 $\mu$ L, 酶 80 $\mu$ L, 反应 6h

R 突变: polyM 100 $\mu$ L, 酶 60 $\mu$ L, 反应 6h

F 突变: polyM 120 $\mu$ L, 酶 80 $\mu$ L, 反应 6h

PyAly: polyM 160 $\mu$ L, 酶 40 $\mu$ L, 反应 6h

20250724.pptx

## 2. 部分正在进行HPLC

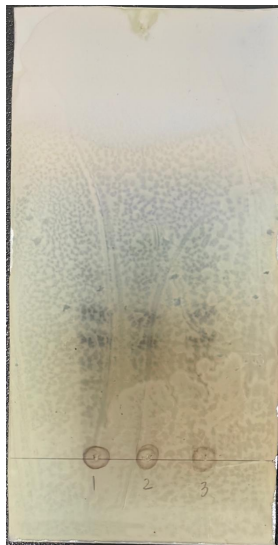
7.25

部分继续HPLC

7.26

由于野生型1mL的被反复冻融，活性大概丧失了，因此取出-80离心管中的菌液重做（-80大离心管解冻大概要3小时！如有需要，下次请提前做好时间！！！解冻完要离心）（-20解冻大概是40分钟多？）

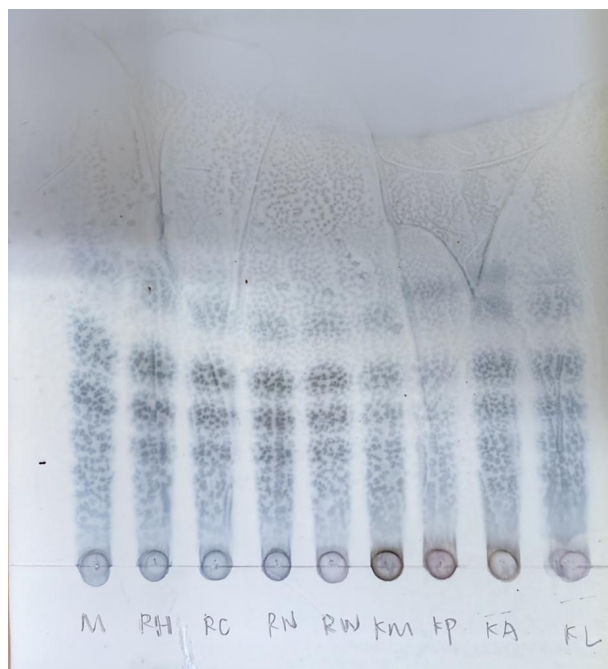




- 1 polyM 160 $\mu$ L, 酶 40 $\mu$ L, 反应8h  
2 polyM 120 $\mu$ L, 酶 60 $\mu$ L, 反应8h  
3 polyM 120 $\mu$ L, 酶 80 $\mu$ L, 反应8h
- 2和3最下面那个条带很浅很浅几乎没有, 说明糖不太够; 然后1有点反应不完全。整体条带都挺浅的, 野生型的活性可能比较低, 或者是变低了。
- 以后野生型推荐使用160底物+80酶的反应体系。

## 7.30

### 1. HPLC结果不理想的几个调整了体系重新做了TLC



野生型: polyM 120 $\mu$ L, 酶 60 $\mu$ L, 反应8h

K172A: polyM 160 $\mu$ L, 酶 40 $\mu$ L, 反应8h

K172M: polyM 160 $\mu$ L, 酶 40 $\mu$ L, 反应8h

K172L: polyM 120 $\mu$ L, 酶 60 $\mu$ L, 反应8h

K172P（活性一直不高）：polyM 100μL，酶 100μL，反应8h

R143C H N W：polyM 80μL，酶 30μL，反应8h

2. 配了一堆培养基，准备做后续的新的F170、R159突变

## 7.31

1. 把昨天的那几个重新做HPLC

2. R159 E C I P L V Q：接种（7个）、扩培、诱导中

3. 把之前保存在-80的酶拿出来分装到一些小ep管中，因为用了太多大离心管，需要清出来一些

## 8.1

1. R159 E C I P L V Q：收菌、超声破碎，从每个大离心管中取了四次 **1mL** 放到小ep管中留存（虽然一次最多可以做7个，但是以后最好一批6个因为离心机是6个位置）

2. R159 N S：转化、涂板，明天跟剩下四个甘油菌一起接种

3. 制胶×2，放在冰箱

## 8.2

R159 G H Y T **N** S：挑单克隆/接种，扩培，诱导

## 8.3

R159 G H Y T S：收菌 超声

N没长出来，后来重新摇了，跟下一批做

## 8.4

1. R159 M A F D K N：接种扩培诱导

2. 配了一批感受态

## 8.5

1. R159 M A F D K N：收菌 超声

（R159的做完了）

2. **E144：提质粒（准备工作）**

3. F170 I Q D E R A：转化

（备注：F170的Y H V T之前做过了，后面做的时候记得不要再做了一次了）

## 8.6

1. F170 I D E R A：挑菌 接种 扩培 诱导

（Q没长出来，重新挑了，摇出来了然后保种）

## 2. E144: PCR 转化

(第二天发现没有长出来……)

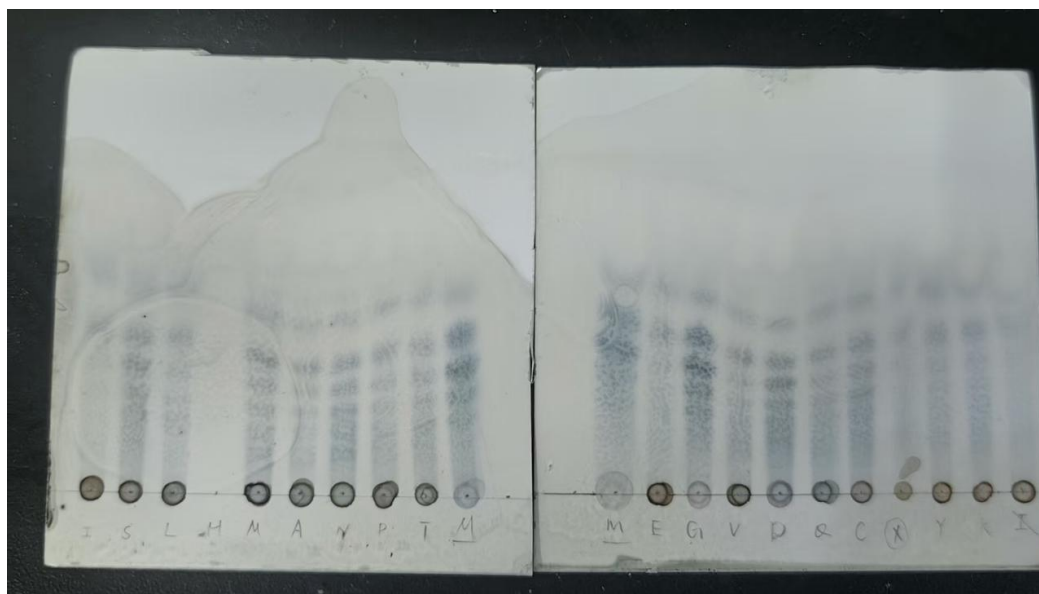
## 8.7

### 1. F170 I D E R A: 收菌 超声破碎 获得酶

### 2. R159 全部: TLC

pyaly:160+80

R159 120+40

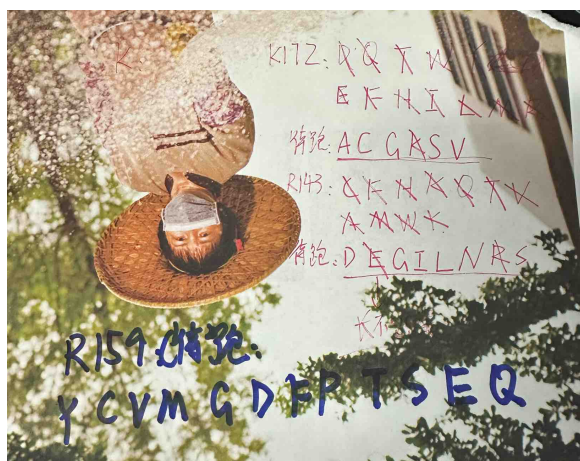


R159x初次tlc:左至右: R159:I\S\L\M\A\N\P\T\PyAly\E\G\V\D\Q\C\Y\K; 少H&W&F

左至右: R159:I\S\L\M\A\N\P\T\PyAly\E\G\V\D\Q\C\Y\K; 少H&W&F

(R159H未点样, 补酶二次反应时出现条带; R159W没有找到对应质粒or菌种)

## 3. sds制样 (参考下图):



问题:

(一) 需要进行: K172G;R143E,8.7转化 (共5个F170x);F170Q的接种。

(二) tlc结果不理想, 酶活性普遍较差, 选取一些进行hplc, 剩余需补酶重新反应。

(三) 需检查R159W是否存在——不存在

## 8.8

实验计划:

1. F170 I D E R A 反应✅，进行TLC 【8.8】
2. F170 Q + 昨日转化 挑取单菌落 F170 接种 保种 扩培……

f170q保的菌没找到，做k172g和r143e

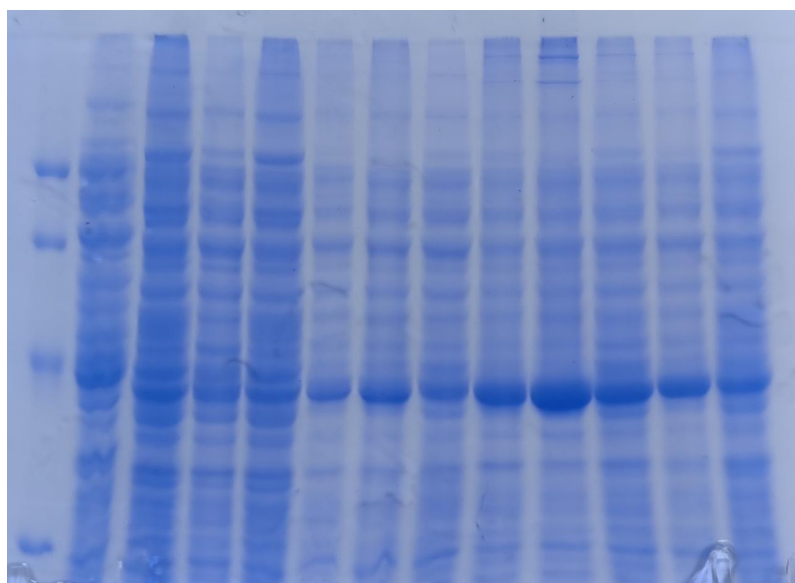
完成实验：

一.hplc

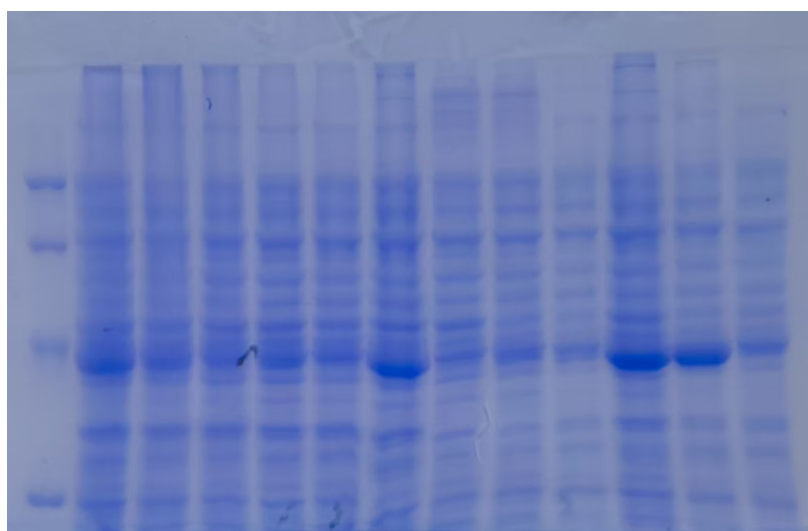
R159-G D

二.SDS-page

胶1：红第一个孔marker 4到13孔： K172-A C S V R143-D G I L N S



胶2：黑 1至12marker R159-C Y V Q E S I H M G D K



染色，洗脱

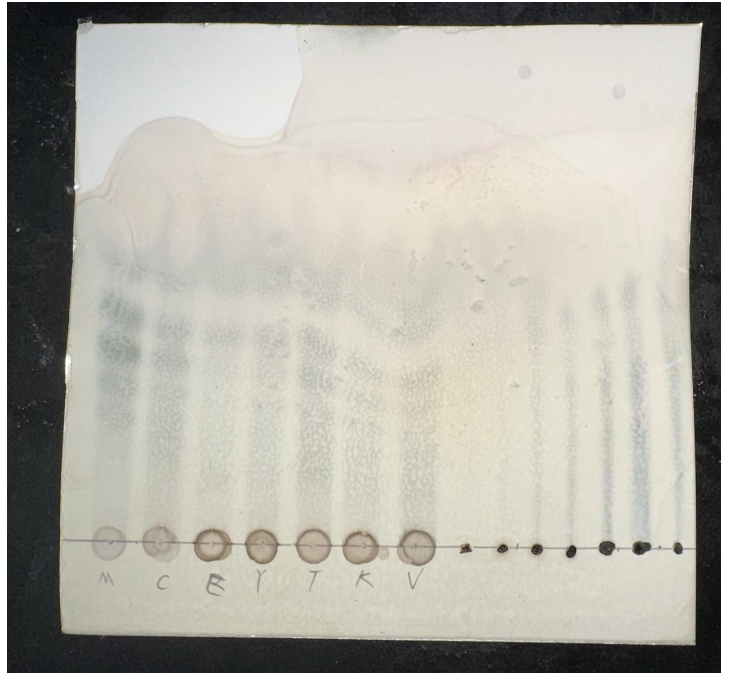
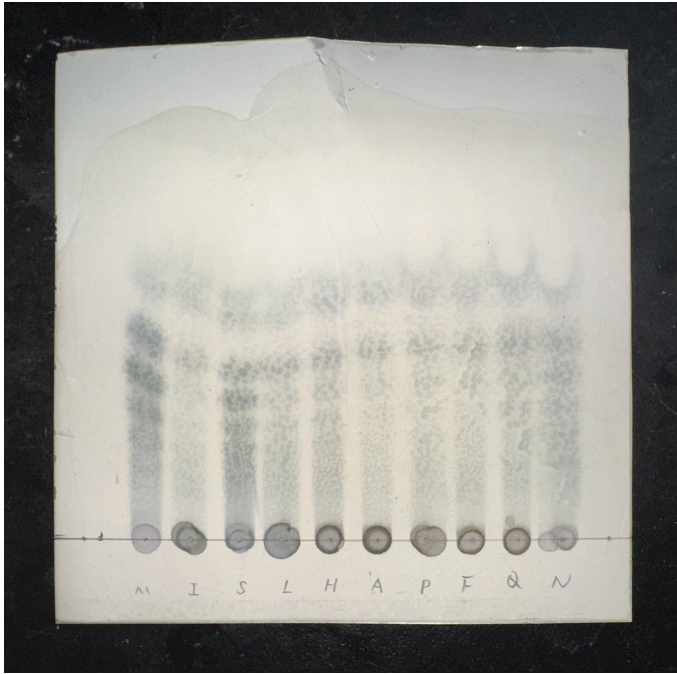
三.酶反应

F170-I D E A R R159-M (6) [初次反应]

R159-I S L H A P F Q N C E N Y T K (15) [再反应 二次加酶]

#### 四.TLC

再反应的15个 (14: 30-19: 00 再次反应4.5h)



#### 五.振荡扩培诱导 F170 M N L W K

#### 六.结论

- (1) R159补酶后与第一次结果基本相同,
- (2) hplc是否要继续全做?

#### 8.9

#### 实验计划

1. SDS-page洗脱拍照+第三板电泳✓
2. 饱和定点突变PCR: (E144) ; 转化加上170剩余, 涂板。
3. 初次反应的TLC&二次加酶冻存保存✓
4. F170 ×5 K172 ×1 收菌 裂解-反应过夜✓

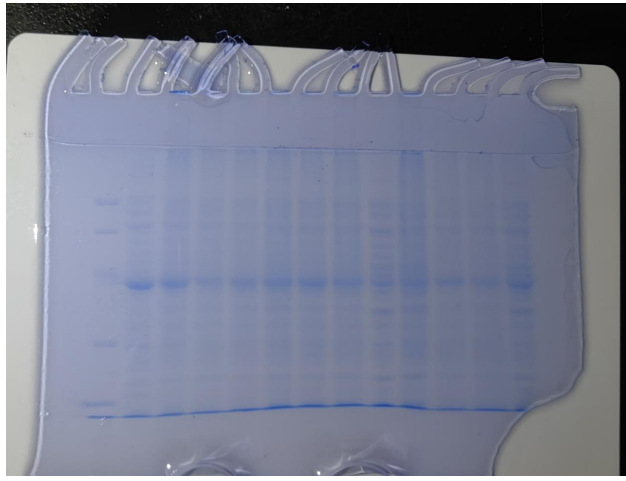
完成实验:

#### 一.SDS-page

胶12清水脱色

胶3: marker | pyaly | F170-E R D I A R159-N P L A F T





上午从浮山拿了试剂，配置显色剂300ml

二.F170 N K M L W 收菌 超声 获酶 反应过夜

三.F170 C S G Q 转化培养(8.10来报---G没长出单菌落重新转化)

8.10

实验计划：

1.E144 pcr 转化

2.TLC

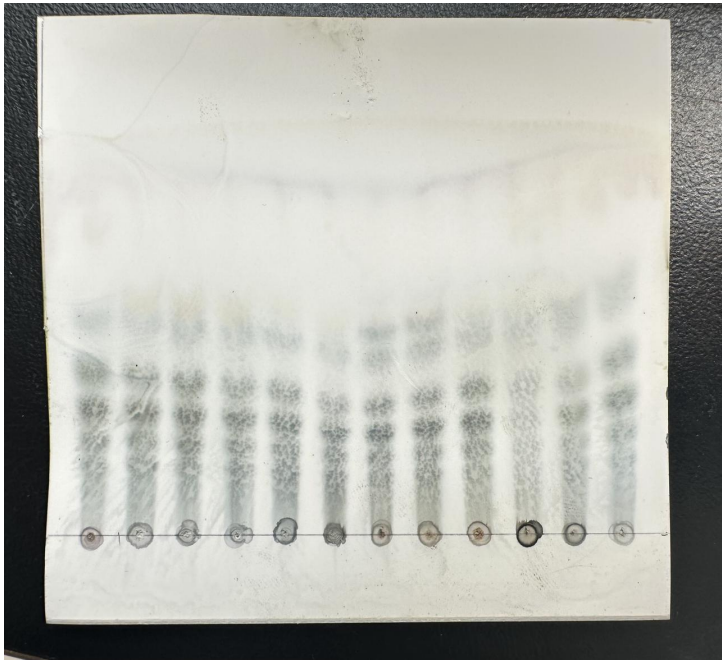
3.SDS-page (F170剩余) ——TEMED没了无法进行

4.挑单克隆 (8.9转化培养的4个)

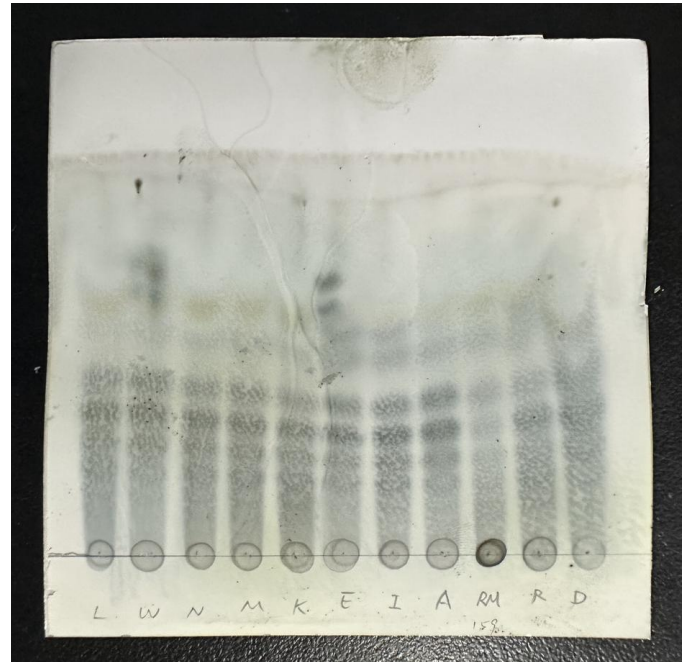
完成实验：

一、挑单菌落，接种：五个F170-CQS & K172G (没长够) & R143E (C没长出来，重新挑，过夜摇菌)

二、TLC



初次反应左至右: PyAly\  
(F170)L\W\N\M\K\E\I\A\R159M\R\D



补酶后左至右: (F170)L\W\N\M\K\E\I\A\R159M\R\D

左至右: **PyAly**\(**F170**)**L**\**W**\**N**\**M**\**K**\**E**\**I**\**A**\**R159M**\**R**\**D**

绿色样品: 180+40 (8.9初次反应过夜)

红色样品: 160+80 (8.8初次反应过夜)

野生型使用上一批 (8.7) 样品

补酶20微升 (15:30-19:30, 约四小时) 后再次tlc:

三、E144 饱和定点突变pcr; 转化

一起转化: F170G E144X ~~R143E~~ (没找到)

过夜培养

8.7-8.10实验结果整理:



8.7-8.9 SDS-PAGE.pptx  
15.63MB





8.7-8.12 TLC.pptx  
70.36MB



截止到目前全部鱼山实验结果整理:



June-July OUC\_DE SDS-  
PAGE.pptx  
32.52MB





June-August OUC\_DE  
TLC.pptx  
124.92MB



8.11

上午: E144pcr空白板上长了杂菌, 重新进行了PCR F170G还没长起来

(清洗培养皿，准备灭菌)

实验计划:

1. 下午收菌F170 QS K172G (3)
2. F170C诱导
3. E144 F170G 单菌落? 期望送测
4. sdspage(等试剂)

完成实验:

(F170G长的很慢但仍挑)

1. F170QS K172G 收菌; F170C诱导
2. E144 pcr 转化 培养
3. f170qs k172g反应17:30开始, 过夜

F170 LWNMKEIARD 重新反应18:15开始, 过夜 (10个)

**体系: 120+40**

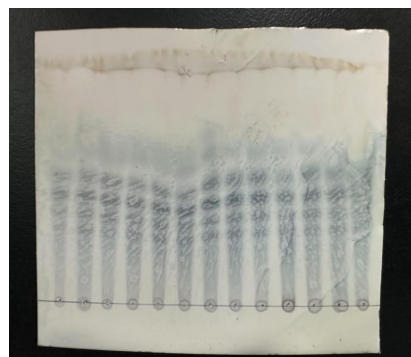
8.12

实验计划:

1. F170G挑单菌落 扩培诱导 (看振荡培养有没有摇起来) E144 挑单菌落 送测 (๖ω๖) × 氨苄!
2. F170G收菌 √
3. TLC 10: 00
4. SDS 配胶 跑SDS-page

完成实验

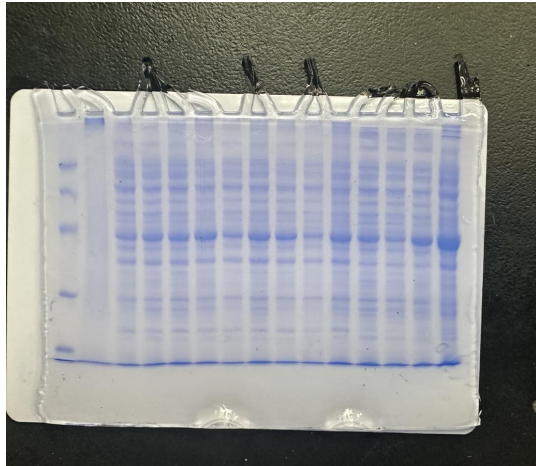
1. F170G 收菌, 超声裂解, 酶直接冻存, SDS制样品
2. F170C 扩培, 诱导
2. TLC: 左至右 PyAly\ (F170) L\W\N\M\K\E\I\A\R\D\Q\ S



左至右 PyAly\  
(F170)L\W\N\M\K\E\I\A\R\D\Q\  
S

### 3.SDSPAGE: PYALY F170M K H Y L V W N T Q G S K172C

(第二个为pyaly, 样品保存不当降解了???)



PYALY F170M K H Y L V W N T Q G S K172C

4.E144! [合十]

## 8.13

实验计划:

1. HPLC 369 计算峰面积5 拿: 4个糖+冰盒里的菌液 (浮)

PyALY

3: F170N

6: F170E

9: F170R

2. 提质粒 测质粒浓度 (浮)
3. E144 单菌落? (鱼) 没有!
4. sdspage拍照 (鱼)

完成实验:

1. 收菌F170C (鱼)
2. 提质粒 (鱼)
3. HPLC F170R测出来仅仅

## 8.14

实验计划:

浮山: 带u盘

HPLC

鱼：N E PyALY金属浴 离心

F170C体系金属浴 离心留存

PCR 配置固体培养基 氨苄!

完成实验:

E144

R-X重新反应明日做TLC

浮山因为老师不在无法补充试剂，于是先回鱼山（）

**8.15**

TLC完成

然后就一直在pcr

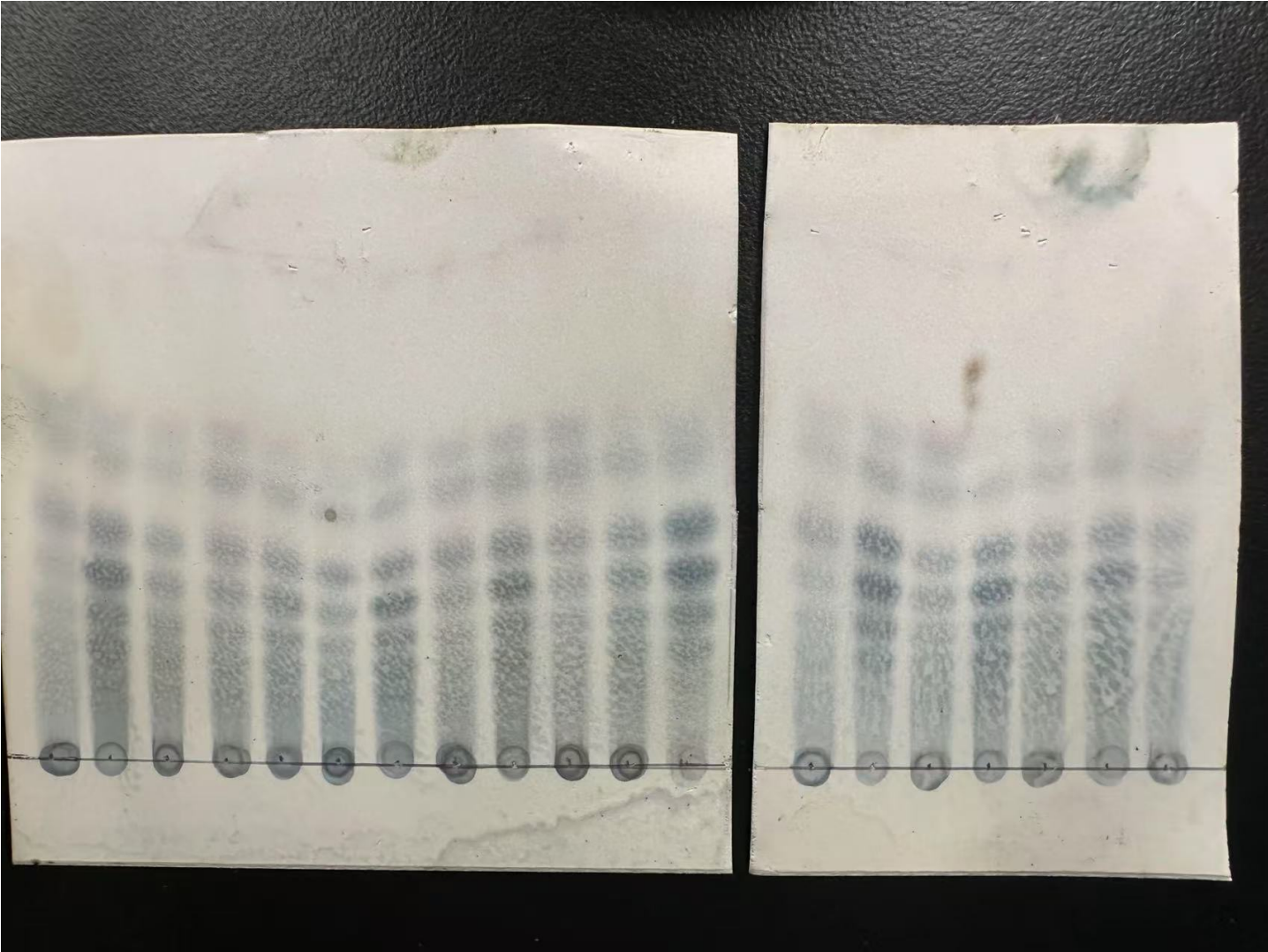
**8.17**

菌出来了!

**8.18**

测序 R-X TLC





左至右：R159:I\|S\L\H\M\A\N\P\T\Y\K\PyAl\y\E\G\V\D\Q\C\F；少W

8.19

8.20

8.21

提质粒

E144X第一次测序结果：T-R-V-I-K-S

| testn  |     | 密码子 | 氨基酸种类 (三字母) | 氨基酸种类 (单字母) |
|--------|-----|-----|-------------|-------------|
| test1  | 1-1 | ACT | Thr         | T           |
| test2  | 1-2 | CGT | Arg         | R           |
| test3  | 1-3 | GTA | Val         | V           |
| test4  | 1-4 | ATT | Ile         | I           |
| test5  | 1-5 | ACT | Thr         | T           |
| test6  | 1-5 | AAG | Lys         | K           |
| test7  | 1-7 | GAA | Glu         | E           |
| test8  | 1-8 | ACG | Thr         | T           |
| test9  | 1-9 | CGG | Arg         | R           |
| test10 | 2-1 | TCT | Ser         | S           |
| test11 | 3-1 | ATT | Ile         | I           |

根据结果挑选（随机）扩培6管：E144-T-R-V-I-K-S

1-9R/1-3V/2-1S/1-4I/1-5T/1-6K

测od，诱导（约三点左右,有一瓶需要晚收菌半小时）

## 8.22

实验安排：

上午9:09左右收菌，E144x饱和定点突变pcr，配置固体培养基倒平板，

配置1500mL液体培养基

下午TLC

等HPLC仪器通知，补跑几个R159X(S/N/T)

完成实验：

1. PCR
2. E144 -S R T K I V 收菌
3. 14:40开始反应 TLC：E144:T-R-V-I-K-S;Pyaly;F170C
4. 点板：左至右：PyAly/(E144)K/V/S/T/R/F170G/I

## 8.23

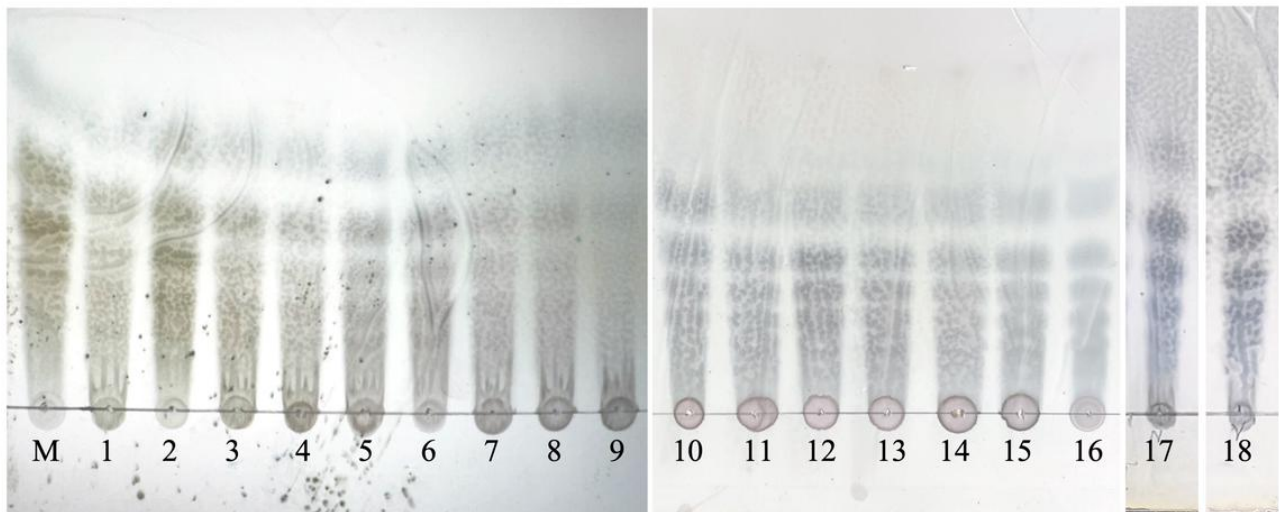
1.挑菌（9:30）；摇菌（9:50-14:50），分装送测

2.TLC补酶（F170-CGSQ）

## 8.24

开始进行组合位点（双位点饱和PCR）

利用原有质粒作为模版在原基础上再次饱和定点突变pcr：K172&R143



M、PyAly  
6、K172S  
12、K172H  
18、K172V  
1、K172D  
7、K172W  
13、K172I  
2、K172Q  
8、K172C  
14、K172L  
3、K172T  
9、K172P  
15、K172M  
4、K172Y  
10、K172E  
16、K172R  
5、K172A  
11、K172F  
17、K172N

K172:Q(+) Nhsty(-) I(中性)

R143:GD (小+) (保留的野生型四糖多余三糖的特征但是并未往四糖增多的方向靠近) ; S(怀疑是负突变)K(怀疑也是负突变, 因为三糖多于四糖)

F170:R(-)N(+)E(中性)

R159 (缺乏产物数据, 只能定性分析) 普遍活性不好 (只有五个酶本身活性还能看sntgd,d很奇怪, **5糖最多**) 8个保留原有分布特征,

总结来讲我推荐172和170作为组合起点,

但是这两个位点的组合因为离得近不知道能不能做组合?

- PCR: 模版R159 N/K; 引物K172 NNK(预计挑菌各两个)
- 提质粒: R159 S/D (组合pcr准备)

8.25

实验计划:

1.172×159 挑菌 摇菌-送测保菌+扩配

159-172组合第一次测序:

编号:

|   |         |
|---|---------|
| 1 | R159N-1 |
| 2 | R159N-2 |
| 3 | R159K-1 |
| 4 | R159K-2 |

红笔标注的需要明天送测

E144测序结果出来了，只测出来一个l

| testn  | 密码子 | 氨基酸种类 (三字码) | 氨基酸种类 (单字母) |
|--------|-----|-------------|-------------|
| test1  | GAG |             | E           |
| test2  | GAA |             | E           |
| test3  | ATT |             | I           |
| test4  | GAA |             | E           |
| test5  | GAA |             | E           |
| test6  | CTG |             | L           |
| test7  | TCT |             | S           |
| test8  | ACG |             | I           |
| test9  | AGT |             | S           |
| test10 | TCT |             | S           |

8.26

HPLC检测器漏水，柱子漏水，拧好后发现柱压不稳（一直浮动，怀疑有气泡）冲柱子（10%甲醇-乙腈-纯甲醇过夜）后跑样品失败（R159H）

下午-晚上过夜冲柱子

认为A泵坏了（8.28晚）

8.27

8.26的pcr，只有R159S-K172 长了菌，挑菌送测（14:43）

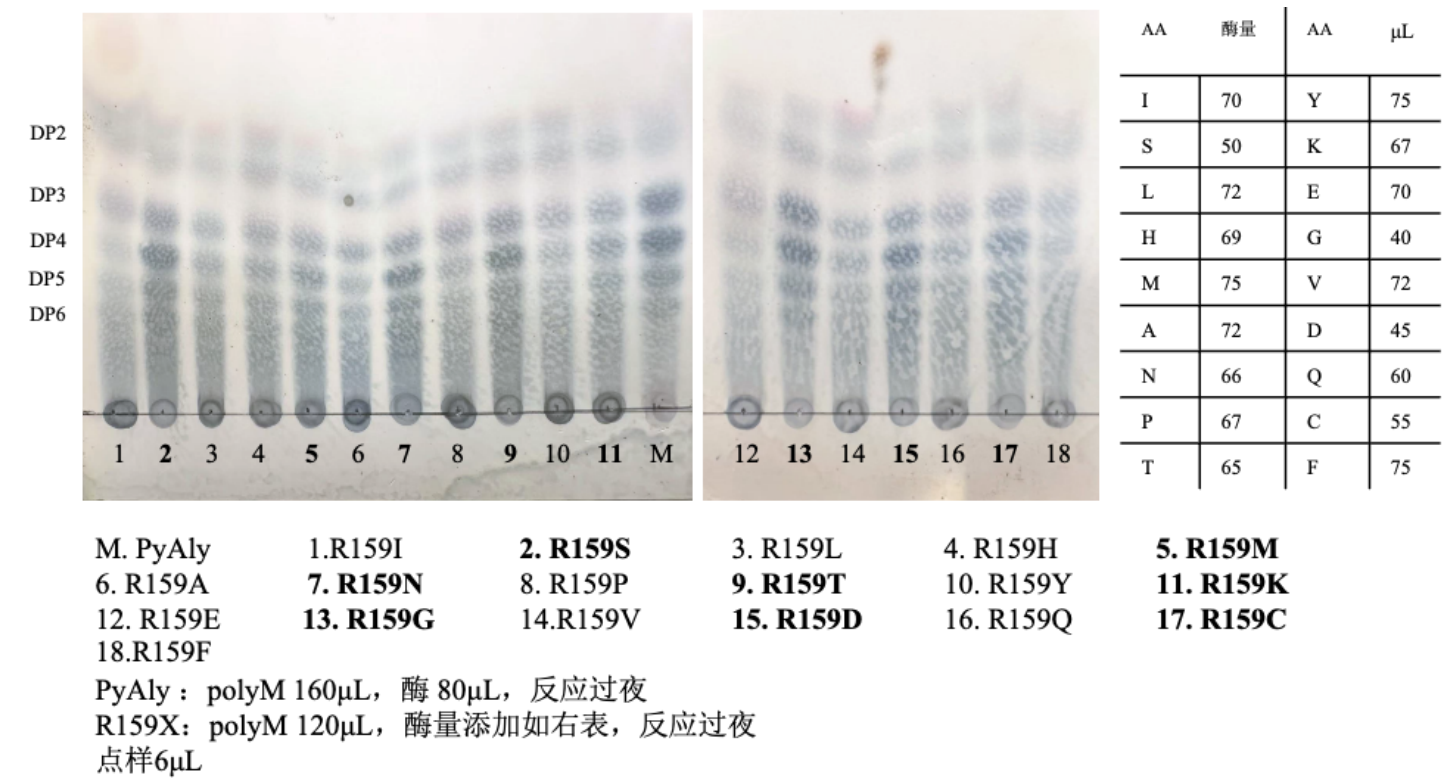
159-172组合第二次测序：

编号：

|   |         |
|---|---------|
| 1 | R159S-1 |
| 2 | R159S-2 |

8.28

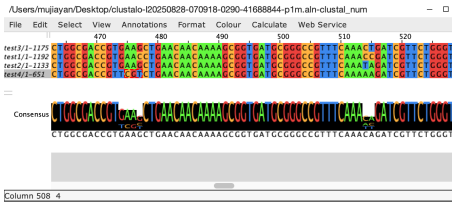
挑了四个菌测序。



| AA | 酶量 | AA | μL |
|----|----|----|----|
| I  | 70 | Y  | 75 |
| S  | 50 | K  | 67 |
| L  | 72 | E  | 70 |
| H  | 69 | G  | 40 |
| M  | 75 | V  | 72 |
| A  | 72 | D  | 45 |
| N  | 66 | Q  | 60 |
| P  | 67 | C  | 55 |
| T  | 65 | F  | 75 |

第一次测序结果出了

|       |                      |   |
|-------|----------------------|---|
| testn |                      |   |
| test1 | <b>R159N-1(AA C)</b> | C |
| test2 | <b>R159K-1(AA G)</b> | C |
| test3 | R159K-2(AAG)         | T |
| test4 | PyAly(CGT)           | A |



159-172组合第三次测序：  
编号：

|   |         |
|---|---------|
| 1 | R159D-1 |
| 2 | R159D-2 |
| 3 | R159N-3 |
| 4 | R159D-4 |

送测

之前的结果

## 8.29

1. 定了170-172引物到货，pcr
2. 浮山hplc



|                                                                                   |                            |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
|   | 8.29-底物 (30微)_UV_VIS_1.txt |
|  | 8.29-乙腈_UV_VIS_1.txt       |
|  | 8.29-PyAly_UV_VIS_1.txt    |
|  | 8.29-R159C_UV_VIS_1.txt    |
|  | 8.29-R159E_UV_VIS_1.txt    |
|  | 8.29-R159F_UV_VIS_1.txt    |
|  | 8.29-R159H_UV_VIS_1.txt    |
|  | 8.29-R159K_UV_VIS_1.txt    |
|  | 8.29-R159N_UV_VIS_1.txt    |
|  | 8.29-R159P_UV_VIS_1.txt    |
|  | 8.29-R159Q_UV_VIS_1.txt    |
|  | 8.29-R159S_UV_VIS_1.txt    |
|  | 8.29-R159T_UV_VIS_1.txt    |
|  | 8.29-R159Y_UV_VIS_1.txt    |

hplc跑样品

## 8.30

### 1. 浮山hplc

|                                                                                     |                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
|    | 8.30-乙腈_UV_VIS_1.txt    |
|    | 8.30-F170A_UV_VIS_1.txt |
|    | 8.30-F170C_UV_VIS_1.txt |
|    | 8.30-F170D_UV_VIS_1.txt |
|    | 8.30-F170G_UV_VIS_1.txt |
|    | 8.30-F170I_UV_VIS_1.txt |
|    | 8.30-F170K_UV_VIS_1.txt |
|    | 8.30-F170L_UV_VIS_1.txt |
|   | 8.30-F170M_UV_VIS_1.txt |
|  | 8.30-F170Q_UV_VIS_1.txt |
|  | 8.30-F170R_UV_VIS_1.txt |
|  | 8.30-F170S_UV_VIS_1.txt |
|  | 8.30-F170W_UV_VIS_1.txt |
|  | 8.30-R159A_UV_VIS_1.txt |
|  | 8.30-R159I_UV_VIS_1.txt |
|  | 8.30-R159L_UV_VIS_1.txt |
|  | 8.30-R159M_UV_VIS_1.txt |
|  | 8.30-R159V_UV_VIS_1.txt |

hplc跑样品

### 2. pcr挑菌

## 9.10

1.SDS-PAGE(T-L/M-L/S-L/K-P/N-L/D-E/N-T/F170C/E144R/E144T/E144S/E144V)

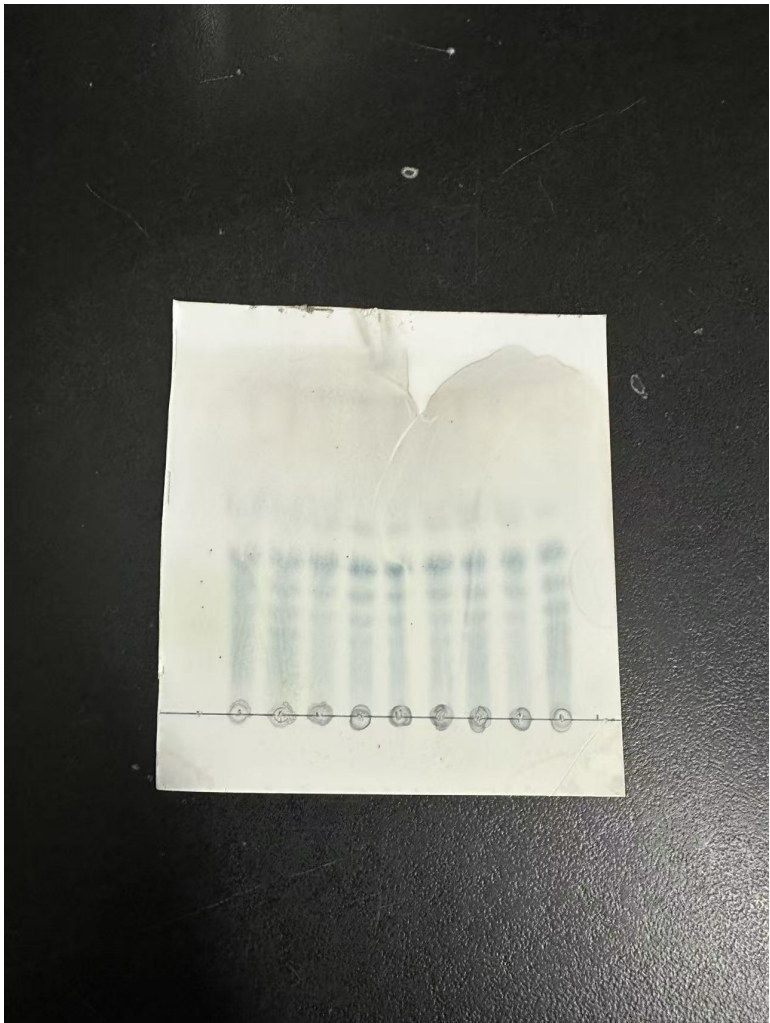
2.挑菌送测 (170)

## 9.12

1.SDSpage

2.测序结果 (170-172) 出来了，师姐帮我们看了测序，接种：

|       |        |        |
|-------|--------|--------|
| 2.R-S | GCT(R) | TCT(S) |
| 3.W-G | ()W    | GGA(G) |
| 6.I-E | ATC(I) | GAC(E) |



R-H/R-L/Q-L/D-Q/N-L/K-P/N-T/D-E/S-P