

## AIM-DIP Broth 自诱导培养基产品说明书

## ● 产品规格和内容:

包装名称	货号	包装含量	包装数量	保存条件/时间
0.5L AIM-DIP Broth	CAT#: AIM1025L-01	23g(可配0.5L AIM-DIP 液体培养基)	5 袋	室温干燥/12 个月
0.5L AIM-DIP Broth	CAT#: AIM1025L-02	23g(可配0.5L AIM-DIP 液体培养基)	10 袋	室温干燥/12 个月
AIM 葡萄糖溶液 (已过滤)	CAT#: C1010-3/6	5 袋包装: 3ml/瓶; 10 袋包装: 6ml/瓶	1 瓶	室温干燥/24 个月
AIM 乳糖溶液 (已过滤)	CAT#: C1090-25/50	5 袋包装: 25ml/瓶; 10 袋包装: 50ml/瓶	1 瓶	室温干燥/24 个月
非蛋白分子伴侣II(已过滤)	-----	5 袋包装: 25ml/瓶; 10 袋包装: 50ml/瓶	1 瓶	4°C/24 个月
100mML-胱氨酸 (已过滤)	-----	5 袋包装: 50ml/瓶; 10 袋包装: 100ml/瓶	1 瓶	-20°C/24 个月
L-还原型谷胱甘肽 GSH	-----	5 袋包装: 3.75g/瓶; 10 袋包装: 7.5g/瓶	1 瓶	-20°C/24 个月
L-氧化型谷胱甘肽 GSSG	-----	5 袋包装: 0.75g/瓶; 10 袋包装: 1.5g/瓶	1 瓶	-20°C/24 个月

## ● 产品组分简介:

产品组分	AIM-DIP Broth 配方 g/L	产品组分	AIM-DIP Broth 配方 g/L
Tryptone	10g	非蛋白分子伴侣 I	0.47g
N-Z-amine AS	6g	硫酸素, 腺嘌呤等	-----
Yeast Extract	5g	镁离子, 钠离子, 钾离子	-----
HY-YEST 444	5g	Glucose (葡萄糖)	-----
17 种氨基酸混合物	2g	Lactose (乳糖)	-----

● PH 值(25°C)7.0±0.2, 本产品加入 PH7.0 的去离子水后 PH 接近 7.0, 可不调 pH 值直接使用。

## ● 产品说明

AIM-DIP Broth: 唯地生物开发, 适合富含二硫键的蛋白表达的自诱导培养基。在其中补充含有更多小肽的蛋白胨、酵母粉、非蛋白分子伴侣、氨基酸混合物、硫酸素、腺嘌呤、葡萄糖、乳糖、镁离子、钠离子、钾离子、胱氨酸、GSH、GSSG 配制成 AIM-DIP Broth, 主要用于大肠杆菌中由 T7 启动子诱导蛋白表达的试验 (或 IPTG 诱导蛋白表达的试验)。与传统的 LB-IPTG 蛋白诱导方法不同, 自诱导培养基允许 T7 启动子系统的自动调节, 诱导表达, 无需检测培养基中菌体 OD 值, 无需添加 IPTG, 并且蛋白表达量比 IPTG 诱导的蛋白量更高。

自诱导培养基作用机制: 在葡萄糖存在时, 大肠杆菌优先利用葡萄糖, 葡萄糖作为半乳糖操纵子的阻遏因子阻止细菌利用  $\alpha$ -乳糖, 促进高密度生长。一旦培养基中的葡萄糖被耗尽 (通常发生在对数中后期), 乳糖被  $\beta$ -半乳糖苷酶转换成异乳糖 (葡萄糖-1,6-半乳糖), 而后者作为 IPTG 诱导型启动子的诱导剂, 促进乳糖阻遏物从启动子的 DNA 结合位点上释放, 启动重组蛋白的表达。对于含有 DE3 元件的大肠杆菌, 异乳糖使 T7lac 启动子去阻遏, 诱导 lacUV5 启动子表达 T7 RNA 聚合酶。通过这种方式, 在原核表达菌生长到某一特定点时蛋白表达自发开始, 无需监测细胞密度 (OD600) 和添加 IPTG。与传统 IPTG 诱导的蛋白表达过程相比, 使用自动诱导培养基极大地方便和简化了试验流程。

**注意:** 哪种自诱导培养基更适合目标蛋白的表达需要做预试验确认, 不同蛋白需要不同的自诱导培养基进行诱导表达, 很难在诱导之前预测结果。

## ● AIM-DIP Broth 自诱导培养基的工作原理

1. 当需要在大肠杆菌细胞质中表达富含二硫键的蛋白时，向培养基中补充特定比例的 GSH 和 GSSG，可调控细胞内氧化还原环境，促进二硫键正确折叠，提高蛋白可溶性。大肠杆菌的细胞质天然是一个强还原性环境，这能防止胞内蛋白质的巯基被意外氧化，但对于需要在胞质中形成二硫键的重组蛋白来说，这会导致二硫键无法形成，或形成后立刻被还原。补充 GSH/GSSG 混合物可以改变胞质的氧化还原平衡，使其从一个强还原状态转变为一个允许并促进二硫键缓慢、正确形成的“适度氧化”状态。GSH/GSSG 水溶液易失活，只能现配先用，配成水溶液后用 0.45um 的滤头过滤除菌，GSH、GSSG 可分别配成 100mM、10mM 的水溶液后过滤除菌（若不能完全溶解，可用微波炉加热促溶，注意不要让温度超过 70 度）。GSH/GSSG 应按比例使用，有两种固定的比例：1, GSH (5mM 即 1.5g/L) +GSSG (0.5mM 即 0.3g/L) ; 2, GSH (2mM 即 0.6g/L) +GSSG (0.5mM 即 0.3g/L)，前者高效还原错误形成的二硫键，适用于二硫键结构简单、对错误折叠敏感的蛋白；后者提供更强的氧化力，有利于形成二硫键，适用于二硫键多且复杂、难以氧化的蛋白。
2. 当需要在大肠周质空间中表达富含二硫键的蛋白时，在培养基中添加 L-胱氨酸有助于维持周质空间的氧化环境，L-胱氨酸可以被转运到周质空间，直接被 DsbA 等酶利用，促进目标蛋白的二硫键快速形成，促进蛋白形成正确构象。试剂盒中的 100mM L-胱氨酸溶液已经过过滤除菌，可直接使用，使用浓度为 2mM。

## ● 使用方法

取 AIM-DIP Broth 粉剂培养基一袋，加适量双蒸水溶解后（溶液体积根据后续补加溶液体积计算，一袋培养基对应总体积为 0.5L），121℃-20min 高压灭菌，灭菌后待温度降到 60 度以下，加入 0.5ml AIM 葡萄糖溶液，5ml AIM 乳糖溶液，混匀后可根据目标蛋白的表达空间选择加入 L-胱氨酸或 GSH/GSSG。加入 L-胱氨酸的培养基可保存一周；加入 GSH、GSSG 的培养基应立即使用，不可保存。

**注意：**非蛋白分子伴侣 II 可加可不加，不同蛋白有不同的最适浓度，实验者可根据目标蛋白不同设置不同的浓度梯度，非蛋白分子伴侣 II 的梯度一般为：0、1%、2%。

蛋白自诱导方法：

1. 准备含有目的质粒的原核表达大肠杆菌单菌落（可质粒转化感受态涂板，也可平板划线）。
2. 小摇接菌：将单菌落接种到含有 1-3ml 含相应抗生素的液体 LB/2YT 的透气试管中。
3. 37℃，200 rpm 过夜摇菌约 10-24h，菌体摇浓，一般要求 OD600>2.0。
4. 按 2-5%的比例接菌到 AIM-DIP Broth 自诱导培养基中，
  - A. 30-37 度诱导：200-300rpm，摇菌 8-24h。
  - B. 15-25 度诱导：200-300rpm，摇菌 12-48h。
  - C. 若所表达蛋白为毒性蛋白或菌体生长过慢，可先在 37 度摇菌，待菌体 OD600=0.8 左右时降低到目标温度。
5. 最佳摇菌时间与所表达蛋白有关，为找到最佳诱导时间可在不同诱导时间点取样检测蛋白表达量。

## ● 注意事项

1. AIM-DIP Broth 自诱导培养基需先补水，121℃-20min 高压灭菌后使用；若发现有严重吸潮现象，停止使用。
2. 少部分蛋白用自诱导培养基的方法诱导蛋白可能不如常规 IPTG 诱导表达系统，遇到此类蛋白可使用常规的 IPTG 诱导方法。
3. 大肠杆菌表达菌株必须含有 lac 操纵子（包括 lacY 和 lacZ），如 BL21（DE3）、Rosetta（DE3）、TB1、Mg1655 等；而 T7 Express lysY 等菌株不含完整的 lac 操纵子，不能使用自诱导培养基。