

1 探討由大腸桿菌表現之重組分子量標準蛋白的最適製備及染色條件

2

3

張浩秦 (5109)

4

2021/05/26

5

大綱

6

一、前言

7

二、重組基因之建立、表現及純化

8

三、以高密度細胞培養添加批式饋料之方式生產重組蛋白質

9

四、重組蛋白質染色條件之最適化探討

10

五、結論

11

摘要

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

十二烷基硫酸鈉聚丙稀醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE) 在分子生物學研究領域上是一個應用廣泛且方便的技術。若欲於 SDS-PAGE 電泳中確認蛋白質之分子量需藉由對照分子量標準蛋白 (protein ladder) 來達成。本研究透過 PIPE cloning 基因重組技術建構大分子量之重組蛋白基因 TreA-PGD，並於 *Escherichia coli* BL21 CodonPlus (DE3) - RIL 菌株中誘導及表現，再透過親合性及分子篩管柱純化目標蛋白，藉此大量生產高純度且低成本之分子量標準蛋白。另外表現過程中以發酵槽進行培養並結合高密度細胞培養策略，使用以甘油為主要碳源之饋料，藉由 pH-stat 的方式進行控制添加，結果顯示目標蛋白於饋料 24 小時後產量達到 436 mg/L。將所生產之分子量標準蛋白以 Remazol 染劑進行染色，透過染劑上的乙烯磺基 (vinyl sulfone group) 與蛋白質上的胺基 (amine groups) 於鹼性環境中加熱使其反應，產生共價鍵結以達到著色之效果。綜合上述本研究結合各種蛋白質之最適製備及染色條件，最終製備出含紅綠藍三種顏色，11 個條帶，分子量介於 17-325 kDa 間，且具商業發展潛力之彩色預染分子量標準蛋白試劑。