

# 蛋白质的表达、分离、纯化实验

蛋白质表达、分离、纯化可以：(1) 探索和研究基因的功能以及基因表达调控的机理；(2) 供作结构与功能的研究；(3) 作为催化剂、营养剂等。

## 实验方法原理

携带有目标蛋白基因的质粒在大肠杆菌 BL21 中，在 37°C，IPTG 诱导下，超量表达携带有 6 个连续组氨酸残基的重组氯霉素酰基转移酶蛋白，该蛋白可用一种通过共价偶连的次氨基三乙酸 (NTA) 使镍离子 ( $\text{Ni}^{2+}$ ) 固相化的层析介质加以提纯，实为金属螯合亲和层析 (MCAC)。蛋白质的纯化程度可通过聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析。

**实验材料：**大肠杆菌 BL21

**试剂、试剂盒：**LB 液体培养基、氨苄青霉素、Washing Buffer Elution Buffer IPTG、蒸馏水、胰蛋白胨、酵母粉、氯化钠

**仪器、耗材：**摇床、离心机、层析柱、离心管、移液枪、枪头盒、烧杯、玻璃棒

## 实验步骤

### 一、试剂准备

1. LB 液体培养基：Tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g, 用蒸馏水配至 1000 mL。
2. 氨苄青霉素：100 mg/mL。
3. 上样缓冲液：100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM Tris, 8M Urea, 10 mM 2-ME, pH8.0。
4. Washing Buffer：100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM Tris, 8 M Urea, pH6.3。
5. Elution Buffer：100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM Tris, 8M Urea, 500 mM Imidazole, pH8.0。
6. IPTG：100mM IPTG (异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷)：2.38g IPTG 溶于 100ml ddH<sub>2</sub>O 中, 0.22 $\mu$ m 滤膜抽滤，-20°C 保存。

### 二、获得目的基因

1. 通过 PCR 方法：以含目的基因的克隆质粒为模板，按基因序列设计一对引物（在上游和下游引物分别引入不同的酶切位点），PCR 循环获得所需基因片段。
2. 通过 RT-PCR 方法：用 TRIzol 法从细胞或组织中提取总 RNA，以 mRNA 为模板，逆转录形成 cDNA 第一链，以逆转录产物为模板进行 PCR 循环获得产物。

### 三、构建重组表达载体

1. 载体酶切：将表达质粒用限制性内切酶（同引物的酶切位点）进行双酶切，酶切产物行琼脂糖电泳后，用胶回收 Kit 或冻融法回收载体大片段。

2. PCR 产物双酶切后回收，在 T4DNA 连接酶作用下连接入载体。

### 四、获得含重组表达质粒的表达菌种

1. 将连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ，根据重组载体的标志（抗 Amp 或蓝白斑）作筛选，挑取单斑，碱裂解法小量抽提质粒，双酶切初步鉴定。

2. 测序验证目的基因的插入方向及阅读框架均正确，进入下步操作。否则应筛选更多克隆，重复亚克隆或亚克隆至不同酶切位点。

3. 以此重组质粒 DNA 转化表达宿主菌的感受态细胞。

### 五、氯霉素酰基转移酶重组蛋白的诱导

1. 接种含有重组氯霉素酰基转移酶蛋白的大肠杆菌 BL21 菌株于 5 mL LB 液体培养基中（含 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素），37°C 震荡培养过夜。

2. 按 1 : 50 或 1 : 100 的比例稀释过夜菌，一般转接 1 mL 过夜培养物于 100 mL（含 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素）LB 液体培养基中，37°C 震荡培养至 OD<sub>600</sub> = 0.6 - 0.8（最好 0.6，大约需 3 h）。取 10  $\mu$ L 样品用于 SDS-PAGE 分析。

3. 对照组不加诱导剂，实验组加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L，37°C 继续培养 1-3h。

4. 12 000 rpm 离心 10 min，弃上清，菌体沉淀保存于 -20°C 或 -70°C 冰箱中。

### 六、氯霉素酰基转移酶重组蛋白的分离、纯化

1. NTA 层析柱的准备：在层析柱中加入 1 mL NTA 介质，并分别用 8 mL 去离子水，8 mL 上样缓冲液洗涤。

2. 重组蛋白的变性裂解：在冰浴中冻融菌体沉淀，加入 5 mL 上样缓冲液，用吸管抽吸重悬，超声波破裂菌体，用振荡器等轻柔的混匀样品 60 min，4°C 12000 rpm 离心 30 min，将上清吸至一个干净的容器中，并弃沉淀。取 10  $\mu$ L 上清样品用于 SDS-PAGE 分析。

3. 上清样品以 10-15 mL/h 流速上 Ni<sup>2+</sup>-NTA 柱，收集流出液，取 10  $\mu$ L 样品用于 SDS-PAGE 分析。

4. 洗脱杂蛋白：用 Washing Buffer 以 10-15 mL/h 流速洗柱，直至 OD<sub>280</sub> = 0.01 分步收集洗脱液，约 3-4 h，取 10  $\mu$ L 洗脱开始时的样品用于 SDS-PAGE 分析。

5. 洗脱目标蛋白：用 Elution Buffer 洗柱，收集每 1 mL 级分，分别取 10  $\mu$ L 样品用于 SDS-PAGE 分析。

#### **注意事项**

1. 选择表达载体时，要根据所表达蛋白的最终应用考虑。如为方便纯化，可选择融合表达；如为获得天然蛋白，可选择非融合表达。

2. 融合表达时在选择外源 DNA 同载体分子连接反应时，对转录和转译过程中密码结构的阅读不能发生干扰。

3. 菌液 OD 值要小于 1，否则细胞太浓太老，不易破碎，且质粒易丢失。

4. 诱导时间最好做一个梯度，不同蛋白诱导时间需摸索。

5. 诱导温度适当摸索：25、30℃。

6. IPTG 浓度：一般在 1 mM 以内，可适当摸索。

7. 超声条件可视实际情况改变，只要使菌体裂解充分即可，即菌液清亮不粘稠。

#### **其他**

##### **一、原核表达**

##### **1. 原核表达简介**

将克隆化基因插入合适载体后导入大肠杆菌用于表达大量蛋白质的方法一般称为原核表达。这种方法在蛋白纯化、定位及功能分析等方面都有应用。

##### **2. 大肠杆菌用于表达重组蛋白的特点**

(1) 易于生长和控制；

(2) 用于细菌培养的材料不及哺乳动物细胞系统的材料昂贵；

(3) 有各种各样的大肠杆菌菌株及与之匹配的具各种特性的质粒可供选择;

(4) 在大肠杆菌中表达的蛋白由于缺少修饰和糖基化、磷酸化等翻译后加工, 常形成包涵体而影响表达蛋白的生物学活性及构象。

### 3. 原核表达载体

通常为质粒, 典型的表达载体应具有以下几种元件:

- (1) 选择标志的编码序列;
- (2) 可控转录的启动子;
- (3) 转录调控序列(转录终止子, 核糖体结合位点);
- (4) 一个多限制酶切位点接头;
- (5) 宿主体内自主复制的序列。

### 4. 原核表达一般程序

获得目的基因 - 准备表达载体 - 将目的基因插入表达载体中(测序验证) - 转化表达宿主菌 - 诱导靶蛋白的表达 - 表达蛋白的分析 - 扩增、纯化、进一步检测