

IPTG 诱导蛋白表达的原理及方法步骤

E.coli 的乳糖操纵子 (元) 含 Z、Y 及 A 三个结构基因，分别编码半乳糖苷酶、透酶和乙酰基转移酶，此外还有一个操纵序列 O、一个启动序列 P 及一个调节基因 I。I 基因编码一种阻遏蛋白，后者与 O 序列结合，使操纵子 (元) 受阻遏而处于关闭状态。在启动序列 P 上游还有一个分解 (代谢) 物基因激活蛋白 (CAP) 结合位点。由 P 序列、O 序列和 CAP 结合位点共同构成 lac 操纵子的调控区，三个酶的编码基因即由同一调控区调节，实现基因产物的协调表达。在没有乳糖存在时，lac 操纵子 (元) 处于阻遏状态。此时，I 序列在 P_I 启动序列操纵下表达的 Lac 阻遏蛋白与 O 序列结合，阻碍 RNA 聚合酶与 P 序列结合，抑制转录启动。当有乳糖存在时，lac 操纵子 (元) 即可被诱导。在这个操纵子 (元) 体系中，真正的诱导剂并非乳糖本身。乳糖进入细胞，经 β -半乳糖苷酶催化，转变为半乳糖。后者作为一种诱导剂分子结合阻遏蛋白，使蛋白构象变化，导致阻遏蛋白与 O 序列解离、发生转录。异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 是一种作用极强的诱导剂，不被细菌代谢而十分稳定，因此被实验室广泛应用。

材料

1、诱导表达材料

(1) LB (Luria—Bertani) 培养基

酵母膏 (Yeast extract) 5g 蛋白胨 (Peptone) 10g

NaCl 10g 琼脂 (Agar) 1-2%

蒸馏水 (Distilled water) 1000ml pH 7.0

适用范围：大肠杆菌

(2) IPTG 贮备液：2 g IPTG 溶于 10 mL 蒸馏水中，0.22 μ m 滤膜过滤除菌，分装成 1 mL /份，-20 °C 保存。

(3) 1× 凝胶电泳加样缓冲液:

50 mmol / L Tris -Cl (pH 6 . 8)

50 mmol / L DTT

2 % SDS (电泳级)

0.1 % 溴酚蓝

10 % 甘油

2、大肠杆菌包涵体的分离与蛋白纯化材料

1) 酶溶法

(1) 裂解缓冲液:

50 mmol / L Tris-Cl (pH 8 . 0)

1 mmol / L EDTA

100 mmol / L NaCl

(2) 50 mmol / L 苯甲基磺酰氟 (PMSF) 。

(3) 10 mg / mL 溶菌酶。

(4) 脱氧胆酸。

(5) 1 mg / mL DNase I。

2) 超声破碎法

(1) TE 缓冲液。

(2) 2×SDS -PAGE 凝胶电泳加样缓冲液:

100 mmol / L Tris-HCl (pH 8 . 0)

100 mmol / L DTT

4 %SDS

0.2 % 溴酚蓝

20 % 甘油

实验方案

1、外源基因的诱导表达

(1) 用适当的限制性内切核酸酶消化载体 DNA 和目的基因。

(2) 按连接步骤连接目的基因和载体，并转化到相应的宿主菌。

(3) 筛选出含重组子的转化菌落，提取质粒 DNA 作限制性内切核酸酶图谱，DNA 序列测定，

确定无误后进行下一步。

(4) 如果表达载体的原核启动子为 PL 启动子，则在 30 -32 °C 培养数小时，使培养液的 OD600 达 0.4-0.6，迅速使温度升至 42 °C 继续培养 3 -5h；如果表达载体的原核启动子为 tac 等，则 37 °C 培养细菌数小时达到对数生长期后加 IPTG 至终浓度为 1 mmol / L。继续培养 3 -5h。

(5) 取上述培养液 1 mL，1000g 离心，1 min，沉淀，加 100 μ L 聚丙烯酰胺凝胶电泳上样缓冲液后，作 SDS -PAGE 检测。

2、大肠杆菌包涵体的分离与蛋白质纯化

1) 细菌的裂解

常用方法有：① 高温珠磨法；② 高压匀浆；③ 超声破碎法；④ 酶溶法；⑤ 化学渗透等。

前三种方法属机械破碎法，并且方法①、②已在工业生产中得到应用，后三种方法在实验室研究中应用较为广泛。下面介绍酶溶法和超声破碎法的实验步骤。

(1) 酶溶法。常用的溶解酶有溶菌酶； β -1,3 -葡聚糖酶； β -1,6 -葡聚糖酶；蛋白酶；壳多糖酶；糖苷酶等。溶菌酶主要对细菌类有作用，而其他几种酶对酵母作用显著。主要步骤为：

① 4 °C , 5000rpm 离心, 15 min , 收集诱导表达的细菌培养液 (100 mL) 。弃上清,
约每克湿菌加 3 mL 裂解缓冲液, 悬浮沉淀。