

## 一、原理

### 1、E . coli 表达系统

E . coli 是重要的原核表达体系。在重组基因转化入 E.coli 菌株以后，通过温度的控制，诱导其在宿主菌内表达目的蛋白质，将表达样品进行 SDS -PAGE 以检测表达蛋白质。

### 2、外源基因的诱导表达

提高外源基因表达水平的基本手段之一，就是将宿主菌的生长与外源基因的表达分成两个阶段，以减轻宿主菌的负荷。常用的有温度诱导和药物诱导。本实验采用异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖昔（IPTG）诱导外源基因表达。

不同的表达质粒表达方法并不完全相同，因启动子不同，诱导表达要根据具体情况而定。

## 二、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  $\mu$ m 滤膜过滤除菌，分装成 1 mL /份，-20  $^{\circ}$ C 保存。

(3) 1 $\times$  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

### 三、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 OD<sub>600</sub> 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 μL 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； $\beta$ -1,3-葡聚糖酶； $\beta$ -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。