

外源目的基因的表达及蛋白纯化实验

实验材料：

蛋白表达相关材料和试剂：目的基因 DRR1-mscl，质粒 pET28a(+) (CCTCC AB 2014339)，核酸内切酶 BamH1、Xho1，LB 培养基，大肠杆菌 DH5 α 菌株 (CCTCC AB 209140)，大肠杆菌 BL21 菌株 (CCTCC AB 204033)，0.1M IPTG，卡那霉素溶液 Kana(50mg/mL)，氯霉素溶液 Chl(85mg/mL)，AxyPrep PCR 清洁试剂盒，Gel Extraction Kit 切胶回收试剂盒 (OMEGA)；

蛋白纯化相关材料及试剂：固定镍离子亲和柱，磷酸盐缓冲液 (pH7.4)，10%TritonX-100 (用 PBS 缓冲液配制)，杂蛋白洗脱溶液 (0.1M 咪唑，0.2%TritonX-100，用 PBS 缓冲液配制)，目的蛋白洗脱溶液 (0.3M 咪唑，0.2%TritonX-100，用 PBS 缓冲液配制)；

蛋白电泳相关溶液：考马斯亮蓝 R-250 染色液(称取 0.25g 考马斯亮蓝，溶于 100mL 脱色液中，存储于室温)；

蛋白胶脱色液：甲醇，水，冰醋酸体积比 9:9:1 混合；

30%丙烯酰胺贮存液：29g 丙烯酰胺和 1g 甲叉双丙烯酰胺溶液蒸馏水，定容至 100mL，4°C 保存；

5×电泳缓冲液：15.1g 三羟甲基甲烷和 94g 甘氨酸，溶于 900mL 水中，等试剂溶解完后，再加入 50mL 10%SDS，最后加去离子水定容至 1000mL；

1.5M Tris-HCl 缓冲液：三羟甲基甲烷 36.6g，加 80mL 去离子水使其溶解，用 1mol/LHCl 调 pH 值到 8.8，再加去离子水定容到 100mL，配好的溶液放于棕色瓶中，存储于 4°C；

0.5M Tris-HCl 缓冲液：三羟甲基甲烷 12.2g，加 80mL 去离子水使其溶解，用 1mol/LHCl 调 pH 值到 6.8，再加去离子水定容至 100mL，配好的溶液放于棕色瓶中，存储于 4°C；

5×蛋白上样缓冲液：250mMTris-HCl(pH6.8)，10%SDS，0.5%BPB，50%甘油，5% β -巯基乙醇。

10%SDS，10%AP(过硫酸铵)。

实验步骤:

一、重组载体的构建

1.目的基因 DRR1-mscI 的扩增与纯化

根据目的基因的序列设计引物, 扩增目的基因。预变性温度为 94°C, 变性时间 10 min; 变性温度、退火温度、延伸温度分别设为 94°C、55°C、72°C, 时间均为 60 s。循环次数设定为 30 次。用 AxyPrep PCR 清洁试剂盒纯化 PCR 产物。

表 1.PCR 引物

引物名称	引物序列	酶切位点
DF	5' -GGAATTCCATATGATGATGTTGAATGGCTTT-3'	BamHI
DR	5' -GCGCTCGAGTCAGAGCGGGCGGCTTCT-3'	XhoI

DF:耐辐射奇球菌 R1 *mscL* 的上游引物 DR: 耐辐射奇球菌 R1 *mscL* 的下游引物

表 2 PCR 反应体系

反应试剂	体积
rTaq	25μl
上游引物	1μl
下游引物	1μl
基因组 DNA	2μl
无菌水	21μl
终体积	50μl

2.目的基因和质粒双酶切

按下表对目的基因 DRR1-mscI 和质粒 pet28a(+) 进行双酶切。并对酶切产物用 Gel Extraction Kit 试剂盒切胶回收。

表 3 双酶切体系

	质粒双酶切体系	扩增产物双酶切体系
BamHI	5μl	5μl
XhoI	5μL	5μL
10×K Buffer	10μL	10μL
酶切 DNA	40μL(5 μg)	50μL(5μg)
无菌水	40μL	30μL
终体积	100μL	100μL

3.目的片段和质粒的连接

0.03pmol 酶切后的载体，0.3pmol 酶切后的目的基因，16℃连接过夜。

4.连接产物转化大肠杆菌

(1) 取对数期的大肠杆菌 DH5 α，分三组离心收集菌体。

(2) 分别加入 100μL 0.2M 的氯化钙，充分混匀，冰上预冷 10min。三组离心管中依次加入等体积未切割的质粒（做为阳性对照），连接产物和水，确保未切割质粒和连接产物的摩尔数相同，充分混匀，在冰上再预冷 15min，随后 42℃ 水浴热激 2min。

(3) 将细菌涂于含卡那霉素的平板上，37℃过夜培养。

5.重组载体的鉴定

挑取上述平板单菌落，接种到含卡那霉素和氯霉素的液体培养基中扩大培养。先对重组载体进行 PCR 初步鉴定，然后进行测序鉴定。

二、目的基因诱导表达及 SDS-PAGE 鉴定

(1) pET28a-*mscL* 重组载体转化到表达菌株 Rossetta。

(2) 分两组在含有卡那霉素和氯霉素的 LB 培养基中培养转化菌株 Rossetta，至 OD600 为 0.6 左右时，实验组加入 0.1M IPTG（终浓度为 0.1mM），对照组加入相同体积的无菌水，37℃诱导表达 2h。

(3) 取上述菌悬液 1.5mL，离心收集菌体，弃掉上清，分别加入 5×蛋白上样缓冲液和水 20、80 微升，重悬菌体，沸水浴 10min，12000RPM 离心 2min，上清即为蛋白胶上样样品。

(4) 对上述样品进行 SDS-PAGE 胶分离，具体配方如下。

表 4 SDS-PAGE 配方

	12%分离胶	5%浓缩胶
去离子水	2.3mL	2.1mL
30%丙烯酰胺混合液	5mL	0.5mL
Tris-HCL	2.5mL	0.38mL
10%SDS	100μL	30μL
10%AP	100μL	30μL
TEMED	4μL	3μL

三、目的蛋白的大量表达和纯化

(1) 对表达菌株进行扩大培养并诱导表达得到 1200mL 菌悬液，离心，弃掉上清，用 18mL 磷酸盐缓冲液重悬菌体。

(2) 在菌悬液中加入 1mgDNA 酶，然后用高压均质机在压力 16000psi 下破碎两次。

(3) 向混合液中加入 10% TritonX-100 2mL，4°C 下混匀 2-3h。

(4) 4°C 下，10000rpm 离心 30min，取上清。

(5) 向上清中加入镍柱 1mL，4°C 下混匀 2h。

(6) 将镍柱悬浮液加到重力柱中，自然沉降，层析过柱。

(7) 用 40mL 杂蛋白洗脱缓冲液洗涤杂蛋白。

(8) 用 2mL 目的蛋白洗脱液洗脱目的蛋白。

四、蛋白浓缩及鉴定

用 Millipore 超滤管对目的蛋白进行离心 (4500xg) 浓缩至 250 μ L。取目的蛋白溶液 2 μ L，分别加入 5x 蛋白上样缓冲液和去离子水 4 μ L 14 μ L，沸水浴 5min，以此为蛋白胶上样样品进行目的蛋白鉴定。

五、蛋白浓度测定

考马斯亮蓝 G-250 染料与蛋白质结合后，染料的颜色从棕色改变为蓝色，同时伴随着吸收峰发生变化，化合物颜色深浅与蛋白质浓度存在关系。基于以上原因，建立起来的一种测定蛋白含量的方法。将蛋白质样品与考马斯亮蓝 G-250 混合，测定在 595nm 处的吸收值。首先建立标准曲线，根据标准曲线，测定出蛋白浓度。

实验操作如下：

(1) 分别取 0 μ L 2 μ L 4 μ L 6 μ L 8 μ L 10 μ L 15 μ L 牛血清白蛋白 (1mg/ml) 标准溶液和 2 μ L 目的蛋白溶液加入到 96 孔板中。并加入磷酸缓冲液补足到 15 μ L。

(2) 每孔分别加入 285 μ L 考马斯亮蓝染液，室温下静置五分钟，使蛋白与染液充分结合。

(3) 用酶标仪测定各孔在 595nm 处的光吸收值。

(4) 根据上步得到的测定数据，绘制出光吸收值对蛋白含量的标准曲线

线，并以此曲线得到目的蛋白的浓度。

实验结果

一、重组质粒的鉴定

1.PCR 鉴定重组质粒

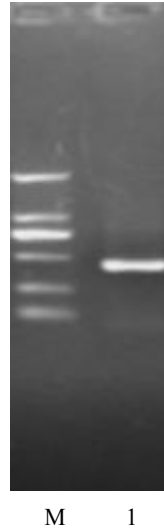


图 1 PCR 鉴定重组载体

M: DNA Marker 2000 Lane1:以重组载体 pET28a+DR-*mscL* 为模板扩增

以提取的重组载体 pET28a+DR-*mscL* 为模板，扩增出的产物大小位于 500bp 和 250bp 之间，这间接的说明了 *Denicoccus radiodurances* R1 的 *mscL* 基因重组到了载体 pET28a 上。

2.测序鉴定重组质粒

Denicoccus radiodurances R1 的 *mscL* 基因（位于上层的碱基序列）与测序结果比对：

GGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCCGGATCCATGT	ATGT	4
TGAATGGCTTTCGGGATTTCAATTTACGTGGCAATGTGGTTGATCTGGCGGTCCGGTGTGGTCAATCGGCGC		74
TGAATGGCTTTCGGGATTTCAATTTACGTGGCAATGTGGTTGATCTGGCGGTCCGGTGTGGTCAATCGGCGC		210
GGCCTTTAACCAATGTGGTGGCGGCCTTTACCAAGGCGTTTCTCGACCCGCTGATTCGCCTGGCGACGGGC		144
GGCCTTTAACCAATGTGGTGGCGGCCTTTACCAAGGCGTTTCTCGACCCGCTGATTCGCCTGGCGACGGGC		280
GGACACGGCAAAAGTGGCGGGCACCTTCGCGGTCACCGCATTACGTTTCGACTGGGGCACCTTCGTTTCCA		214
GGACACGGCAAAAGTGGCGGGCACCTTCGCGGTCACCGCATTACGTTTCGACTGGGGCACCTTCGTTTCCA		350
CCCTCATCAACTTCTGCTGACCGCCGCGCTGTGACTTCTTCGTCGTCATGCCATGAACGCGGCGAC		284
CCCTCATCAACTTCTGCTGACCGCCGCGCTGTGACTTCTTCGTCGTCATGCCATGAACGCGGCGAC		420
TGAGCGCCTCAAGCGCAGCGAAAAGGCCCGCAAGCTGAGCCAGCAACGAAGAAAAGCTGCTGGCCGAA		354
TGAGCGCCTCAAGCGCAGCGAAAAGGCCCGCAAGCTGAGCCAGCAACGAAGAAAAGCTGCTGGCCGAA		490
ATCCGCGACGCGGTGAGAAAGCCGCCGCTCTGA		387
ATCCGCGACGCGGTGAGAAAGCCGCCGCTCTGACTCGAGCACCAACCACCACCCTGAGATCCGGCTG		560

二、目的蛋白表达的 SDS-PAGE 鉴定

从图 2 中可以看出，目的蛋白得到表达。

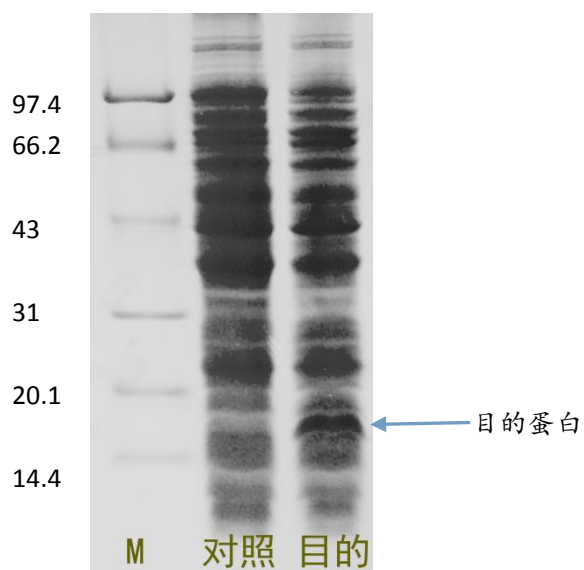


图 2 目的蛋白表达 SDS-PAGE 鉴定

M:蛋白 marker 对照: 对照组细菌的蛋白条带 目的: 实验组细菌的蛋白条带

三、纯化目的蛋白的 SDS-PAGE 鉴定

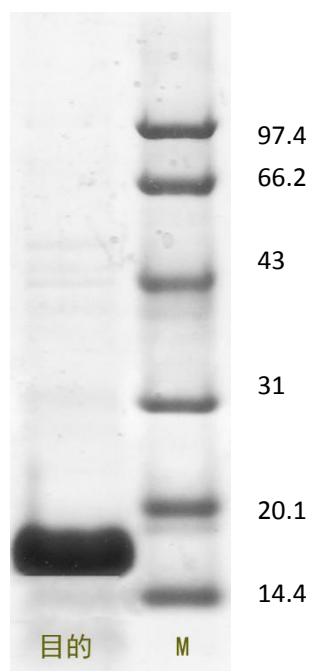


图 3 纯化目的蛋白表达 SDS-PAGE 鉴定

M:蛋白 marker 目的: 纯化蛋白条带

四、蛋白含量测定

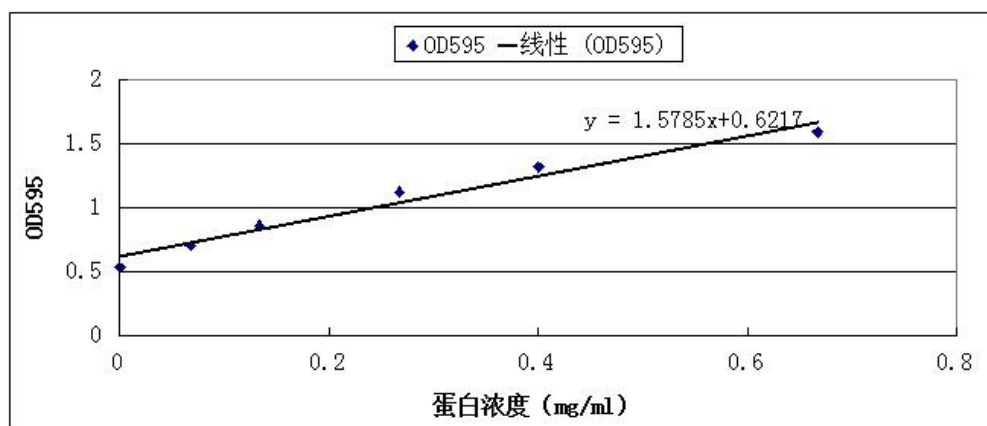


图 4 浓度标准曲线

根据上述标准曲线得知，目的蛋白的浓度为 9mg/ml。

教学建议：

不同的蛋白其诱导表达所需的最适 IPTG 的浓度、温度、表达时间、和开始诱导表达的 OD600 值各不相同，应具体问题具体对待，逐一摸索。

目的蛋白的洗脱咪唑浓度也因蛋白的特性而已，要设置不同梯度尝试。