

大肠杆菌表达系统

大肠杆菌蛋白表达原理

诱导原理:Lac 阻遏物是一种具有 4 个相同亚基的四级结构蛋白,都有一个与诱导剂结合的位点。在没有乳糖存在时,lac 操纵子(元)处于阻遏状态,Lac 阻遏物能与操纵基因 O 结合,阻碍 RNA 聚合酶与 P 序列结合,抑制转录起动。而当有诱导剂与阻遏蛋白结合后,其蛋白构象就发生变化,导致阻遏物从操纵基因 O 上解离下来,RNA聚合酶不再受阻碍,发生转录。详情见 IPTG 诱导蛋白表达的原理

大肠杆菌表达系统步骤

不包括基因构建等上游操作和蛋白纯化部分。基因构建参考<u>密码子优化</u>,蛋白纯化参考蛋白纯化专题。以下内容主要包括蛋白表达鉴定:

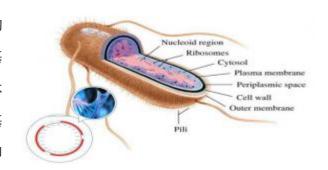
- 1. 表达鉴定第一天的任务,常用抗性选择根据感受态细胞选择
 - 拿到质粒,离心(3000r/min;2min)
 - 在质粒中加入 TE(使质粒最终加入到 110μL 感受态细胞中的量为 80-100ng,据此确定加入 TE 的量
 - 一般为(1μg 质粒加 20μLTE; 2μg 质粒加 50μLTE; 5μg 质粒加 100μL TE)
 - 将质粒与 TE 混匀,加入 2µL 混液于感受态细胞中
 - 将感受态细胞放入冰箱(4℃)中,30min
 - 取出后立即放入水浴锅中(42℃),热激90s,
 - 再次放入冰箱(4℃)中,3min
 - 拿出后取 200µL 的 LB 液体培养基加入到已转入质粒的感受态细胞中
 - 放入揺床(37℃; 195r)中, 30nim至60min; (最佳45min)
 - 取出离心(3000r/min; 2min)
 - 去掉 200µL 的上清,留 100µL 左右上清悬浮沉淀,吸取 50µL 悬液涂平板,(先将对应抗性的平板放入培养箱(37℃)中预热 20min)
 - 把平板放入培养箱(37℃),过夜(12h至16h)
- 2. 表达鉴定第二天的任务,注意 Pcold 的表达温度
 - 每个平板挑取单菌落至 4 支对应抗性的 LB (4ml) 试管中,编号为 "0" "1" "2" "3"



- 将试管放入摇床(37℃;195r)中,(单抗3h左右;双抗4左右;刚开始用可见分光光度计测OD值;
 熟练后可目测(背光下,以试管中的枪头为例,刚刚看不见枪头即可)),测OD值(0.6至0.8)
- 从 "0" 号管中取 700µL 悬液加入到 100µL (C=80%)的保种甘油中,震匀,放入冰箱 (-20℃)冻存
- 在每组菌的 "1" "2" "3" 号试管中分别加入 2μL 的 IPTG (终浓度 0.5mM 最适)
- 视不同的载体选择适合的表达环境(PET/PGEX:15℃表达过夜;25℃表达 6h;37℃表达 3h至 4h(4 支 试管, "0" "1"号试管 15℃表达过夜; "2" "3" 试管 37℃表达 3h至 4h)。Pcold:全部 15℃表达 过夜)
- 3. 表达鉴定第三天,全菌的表达鉴定分析,注意控制溶质的量及溶液黏度
 - 从每组 4 支的试管中均取 500µL 菌液加入到 1.5ml 离心管中, (若 OD 值不一样,值小的可多取)离心
 (6000r/min),5min,去上清,留沉淀(沉淀少的,可再取菌液离心,尽量使沉淀量接近)
 - 在每个离心管中加入 500μL 的 DDH2O,悬浮沉淀,离心(6000r/min),5min,去上清,留沉淀
 - 在每支离心管中加入 45μL 的 1×PBS 和 45μL 的 2×Loading Buffer 悬浮沉淀(当溶质适量且均一的情况下,加入量不变;当溶质多且粘稠时,应使加入量增大,为降低粘度也可减少上液量)
 - 放入煮样器(100°C) 25min
 - 取出后离心 (6000r/min) 3min , 电泳检测。

大肠杆菌表达系统

 质粒载体:小型环状 DNA,能自我复制。一个完整的 质粒载体必须要有复制起点、启动子、插入的目的基 因、筛选标记以及终止子;此外对大肠杆菌表达载体 的要求是:①操纵子以及相应的的调控序列,外源基 因产物可能会对大肠杆菌有毒害作用;②SD序列,即



核糖体识别序列,一般SD序列与起始密码子之间间隔7-13bp翻译效率最高;③多克隆位点以便目的基因插入到适合位置。

• 目的基因:在大肠杆菌表达体系中要表达的基因即外源基因,包括原核基因和真核基因;原核基因可以在大肠杆菌中直接表达出来,但是真核基因韩有内含子不能,大肠杆菌不能对 mRNA 进行剪切,从而形成成熟的 mRNA,所以真核基因一般以 cDNA 的形式在大肠杆菌表达系统中表达。此外还需提供大肠杆菌能识别的且能转录翻译真核基因的元件。



表达宿主菌:表达蛋白的生物体即大肠杆菌。表达宿主菌的选择在大肠杆菌蛋白表达过程中是很重要的因素——多数人会直接选择实验室曾经用过的宿主菌,而不去追究原因。对于宿主菌的选择主要根据宿主菌各自的特征及目的蛋白的特性,例如目的蛋白需要形成二硫键,可以选择 Origami 2 系列,Origami 能显著提高细胞质中二硫键形成几率,促进蛋白可溶性及活性表达;目的蛋白含有较多稀有密码子可用Rosetta 2 系列,补充大肠杆菌缺乏的七种(AUA,AGG,AGA,CUA,CCC,GGA 及 CGG)稀有密码子对应的 tRNA,提高外源基因的表达水平。

大肠杆菌表达现象	可能原因	建议宿主菌
		Rosetta 2
无蛋白表达或出现截短蛋白	密码子偏移性	Rosetta gami 2
		Rosetta gami B
		RosettaBlue
细胞死亡,生长极困难	基因产物为毒性蛋白	pLysS 菌株
		rigami 2
蛋白无活性	蛋白错误折叠	Rosetta gami 2
		Rosetta gami B
无克隆生长	过高本底表达	pLysS、pLysE 菌株

大肠杆菌表达系统种类

• T7 大肠杆菌表达系统

以 T7 启动子、T7RNA 聚合酶等 T7 噬箘体转录体系的元件为核心构建的表达系统。T7 RNA 聚合酶一种高活性的 RNA 聚合酶, mRNA 的合成速度比大肠杆菌内的 RNA 聚合酶快 5 倍,并某些不能被大肠杆菌 RNA 聚合酶转录的序列也可以转录,所以 T7 RNA 聚合酶和 T7 噬箘体启动子的存在的情况下,大肠杆菌本身的转录竞争不过 T7 噬 窗体转录体系,最终受 T7 噬箘体启动子控制基因的转录。

• Lac 和 Tac 大肠杆菌表达系统

它是以大肠杆菌 lac 操纵子调控机理为基础设计、构建的大肠杆菌表达系统,具有多顺反子结构,结构排列为:

启动子(lacP) - 操纵基因(lacO) - 结构基因(lacZ-lacY-lacA)

Tel: (025) 5889-4959 www. DetaiBio. com Sales@DetaiBio. com



原理:在无诱导物的情况下,负调节因子 lacl 基因产物形成四聚体阻遏蛋白与启动子下游的操纵基因紧密结合,阻止转录的起始。加入诱导剂后,IPTG 与 lacl 基因产物结合,使操纵基因解离出来,lac 操纵子的转录因此被激活。用 tac 启动子构建的表达系统称为 Tac 表达系统。

• PL 和 PR 大肠杆菌表达系统

以启动子 PL、PR 为核心构建的表达系统。PL 和 PR 表达系统具有很强的启动转录能力,诱导时不需要加入化学诱导剂,成本低廉,但在热刺激过程中,大肠杆菌中的一些蛋白水解酶会被激活,降解所表达的外源蛋白;其次是在大规模发酵培养菌体时,通过热平衡交换方式提高温度,需要较长的时间,这会降低诱导效果,从而对重组蛋白的表达量有影响。

此外还有其他表达系统,如 pH 调控型、营养调控型、糖原调控型等。

大肠杆菌表达系统比较

种类	优点	缺点
T7 大肠杆菌表达系统	目的基因的表达水平高	较高的本底表达
Lac 表达系统	易于调控和操作	对表达和制备用于医疗的重组蛋白不适合
Tac 表达系统	易于调控,转录水平高于 lac	对表达和制备用于医疗的重组蛋白不适合
PL 和 PR 表达系统	不需要加入化学诱导剂,成本又低	可能降解所表达的重组蛋白,不适合大规
	廉,转录能力强	模培养

大肠杆菌与其他表达系统比较

表达系统	优点	缺点
大肠杆菌	大肠杆菌表达系统具有表达背景清楚,表达水平高,	表达真核基因只能用其 cDNA ,不能进行
表达系统	操作简单,培养周期短,抗污染能力强	翻译后的修饰加工,含有大量内毒素
哺乳动物	可以使蛋白正确折叠,提供复杂的 N 型糖基化和准	产率低,某些糖基化产物不稳定、不易纯
表达系统	确的 O 型糖基化等加工修饰, 更接近于天然蛋白	化,费用昂贵
酵母表达系统	使用简单,表达量高,可大规模生产,与原核相比	酵母表达蛋白有时会出现蛋白切割问题。
	可对异源蛋白修饰	
昆虫表达系统	高效表达,完善的加工修饰,易从无血清上清中纯	外源蛋白表达处于极晚期病毒启动子的
	化蛋白,无内毒素	调控之下,由于病毒感染,细胞开始死亡,
		无法进行连续性表达

更多优质服务推荐



SingleB® MAb Discovery Service SingleB®单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务,利用SmartFlow®FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛 选平台,实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象,从动物免疫到获得 单抗,快至29天,比传统杂交瘤技术至少节省120天。

平台优势



支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫



记忆B细胞&浆细胞双筛选,保证B细胞多样性



单细胞扩增阳性率高,无需刺激培养,减少多样性损失



重轻链天然配对, 亲和力更优

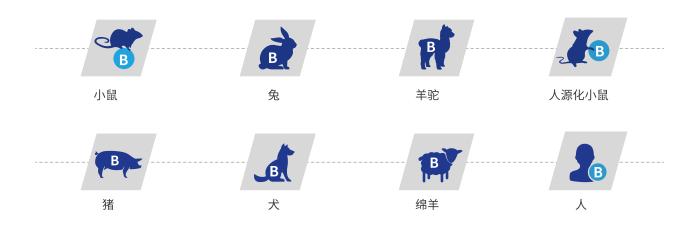


高通量,周期短,单抗发现快至29天

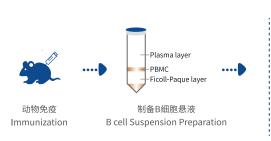


ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种



服务流程











BGE®高通量表达 BGE®HTP Expression



FACS Assay



Elisa 检测 Elisa Assay



德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、(Fab')₂、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长lgG、lgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势



服务流程





德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求,我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务;我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器,用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。





德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术,能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

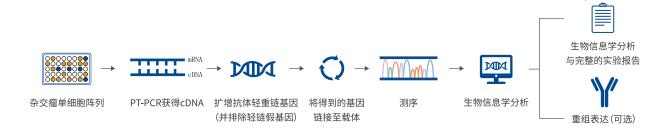
应用场景

- 抗体序列保护:获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份:杂交瘤存在退化转阴风险,抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造:获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验:测序5天,表达5天,全程高通量
- 细胞需求少:只需1~5个细胞,可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确:采用Failsafe®假基因排除技术,可排除κ轻链假基因
- 测序范围广:可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的lgM和lgG的所有亚型
- 一站式服务:德泰生物拥有丰富经验,可提供表达验证服务

服务流程

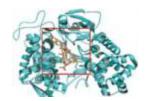


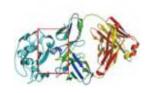


德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down,免疫共沉淀,酵母双杂交等相比,具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

检测范围









蛋白和蛋白蛋白和小分子

蛋白和抗体

蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。



德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势



重链和轻链同时参与优化



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当

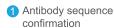


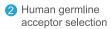
改造后的抗体人源化程度>90%



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

















Stable Cell Line Development Service

生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	

服务流程





















基因合成&质粒抽提

稳定转染

On-chip筛选

压力筛选

扩大培养

交付单克隆细胞株

服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株 较传统方法快近100天



百k级筛选通量

一次筛选640k细胞 优选高表达细胞株



可视化筛选结果

先进DeepLight®平台 高表达细胞株实时成像



稳定高产

可稳定转代50代 重组单抗可达5 g/L