

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，抑制转录启动。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[密码子优化](#)，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 110 μ L 感受态细胞中的量为 80-100ng，据此确定加入 TE 的量
- 一般为（1 μ g 质粒加 20 μ L TE；2 μ g 质粒加 50 μ L TE；5 μ g 质粒加 100 μ L TE）
- 将质粒与 TE 混匀，加入 2 μ L 混液于感受态细胞中
- 将感受态细胞放入冰箱（4 $^{\circ}$ C）中，30min
- 取出后立即放入水浴锅中（42 $^{\circ}$ C），热激 90s，
- 再次放入冰箱（4 $^{\circ}$ C）中，3min
- 拿出后取 200 μ L 的 LB 液体培养基加入到已转入质粒的感受态细胞中
- 放入摇床（37 $^{\circ}$ C；195r）中，30min 至 60min；（最佳 45min）
- 取出离心（3000r/min；2min）
- 去掉 200 μ L 的上清，留 100 μ L 左右上清悬浮沉淀，吸取 50 μ L 悬液涂平板，（先将对应抗性的平板放入培养箱（37 $^{\circ}$ C）中预热 20min）
- 把平板放入培养箱（37 $^{\circ}$ C），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”

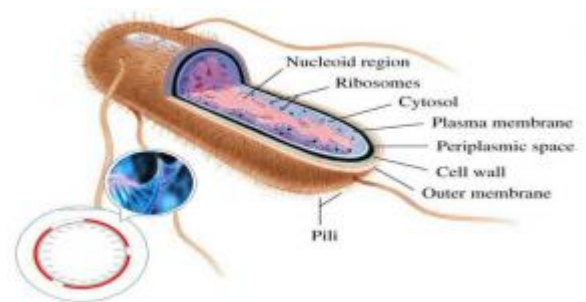
- 将试管放入摇床 (37°C ; 195r) 中, (单抗 3h 左右; 双抗 4 左右; 刚开始用可见分光光度计测 OD 值; 熟练后可目测 (背光下, 以试管中的枪头为例, 刚刚看不见枪头即可)), 测 OD 值 (0.6 至 0.8)
- 从“0”号管中取 700 μ L 悬液加入到 100 μ L (C=80%) 的保种甘油中, 震匀, 放入冰箱 (-20°C) 冻存
- 在每组菌的“1” “2” “3” 号试管中分别加入 2 μ L 的 IPTG (终浓度 0.5mM 最适)
- 视不同的载体选择适合的表达环境 (PET/PGEX : 15°C 表达过夜; 25°C 表达 6h ; 37°C 表达 3h 至 4h (4 支试管, “0” “1” 号试管 15°C 表达过夜; “2” “3” 试管 37°C 表达 3h 至 4h)。Pcold : 全部 15°C 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 500 μ L 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 500 μ L 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 45 μ L 的 1 \times PBS 和 45 μ L 的 2 \times 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, 但是真核基因含有内含子不能, 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
无蛋白表达或出现截短蛋白	密码子偏移性	Rosetta 2 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 噬菌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 噬菌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 噬菌体转录体系，最终受 T7 噬菌体启动子控制基因的转录。

- Lac 和 Tac 大肠杆菌表达系统

它是大肠杆菌 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）

原理：在无诱导物的情况下，负调节因子 lacI 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 lacI 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，成本又低廉，转录能力强	可能降解所表达的重组蛋白，不适合大规模培养

大肠杆菌与其他表达系统比较

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

