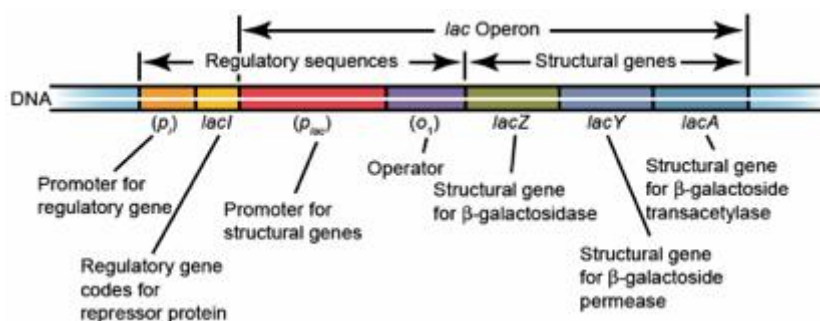


原核表达-IPTG 诱导表达原理及实验步骤

在原核蛋白表达体系中，如 E.coli ([大肠杆菌表达系统](#))，外源基因通常需要诱导剂的诱导才能进行表达，本文详细讲述了常用诱导剂 IPTG 诱导原理，对外源蛋白诱导表达原理以及实验步骤。

原核生物绝大多数的基因按功能相关性成簇地排列，且密集于染色体上，共同形成一个转录单位——操纵子，也称基因表达的协同单位。E.coli 的乳糖操纵子含 Z、Y 及 A 三个结构基因，分别编码 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase)、通透酶 (permease) 和乙酰基转移酶 (transacetylase)；此外还有调控基因：操纵序列 O (operator)、启动序列 P (promoter)；而 I(编码 Lac 阻遏物，Lac repressor)不属于乳糖操纵子。

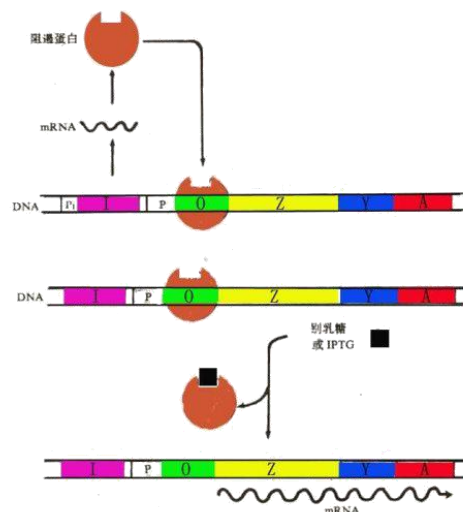


乳糖操纵子结构基因

IPTG 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 (即下图中的阻遏蛋白) 能与操纵基因 O 结合，阻碍 RNA 聚合酶与 P 序列结合，阻止了转录的路径，从而抑制转录启动。而当有诱导剂 (这里指 IPTG) 存在时，诱导剂可与阻遏蛋白结合，使阻遏蛋白构象发生变化，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，启动子 P 开始发生转录，启动反应开始发生转录。

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——即生理上的诱导剂。而在实验中，通常选用异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 作为诱导剂，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。

IPTG 诱导表达实验方法

材料

试剂和培养基	配料
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 1L pH 7.0
IPTG 贮备液	● 2g IPTG 溶于 10mL 蒸馏水中 0.22μm 滤膜过滤除菌，分装成 1mL/份，-20℃保存
凝胶电泳加样缓冲液	● 50mmol/L Tris-CL(pH6.8) ● 50mmol/L DTT ● 2%SDS (电泳级) ● 0.1%溴酚蓝 ● 10%甘油

原核表达鉴定详细实验步骤

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，吸取 2μL 混液与感受态细胞混匀
 - 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

- 放入摇床 (37°C; 195r) 中, 30min 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°C) 中预热 20min】
- 把平板放入培养箱 (37°C), 过夜 (12h 至 16h)

2. 表达鉴定第二天的任务, 注意 Pcold 表达载体的表达温度

- 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 4h 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°C) 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, 可根据日后表达摸索】
- 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 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。
- 蛋白表达量不错, 进行蛋白纯化; 蛋白表达量低或者没表达, 可参考[原核表达 FAQ](#) 相对应解决方案解决。

4. 蛋白纯化: 见[蛋白纯化专题](#)

更多优质服务推荐

1

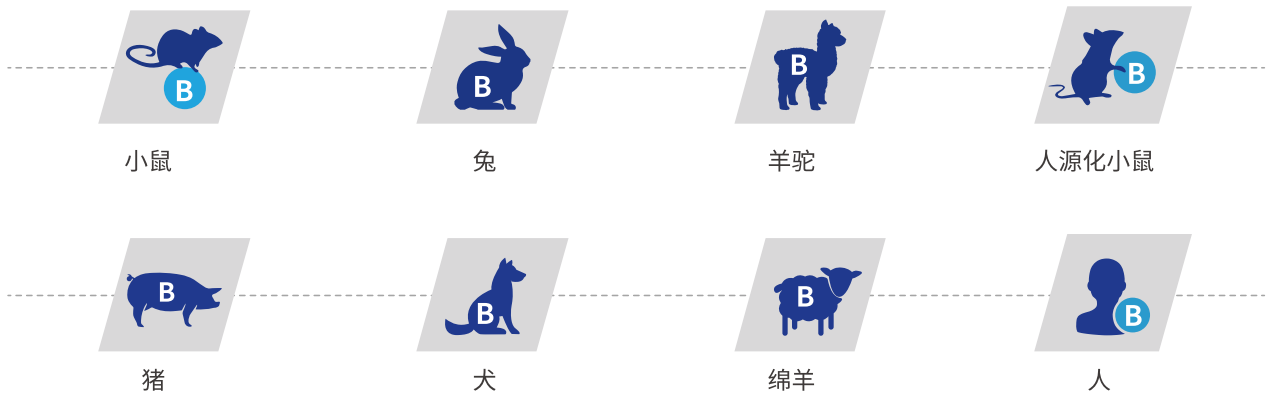
SingleB® mAb Discovery Service SingleB®单B细胞快速单抗发现

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。

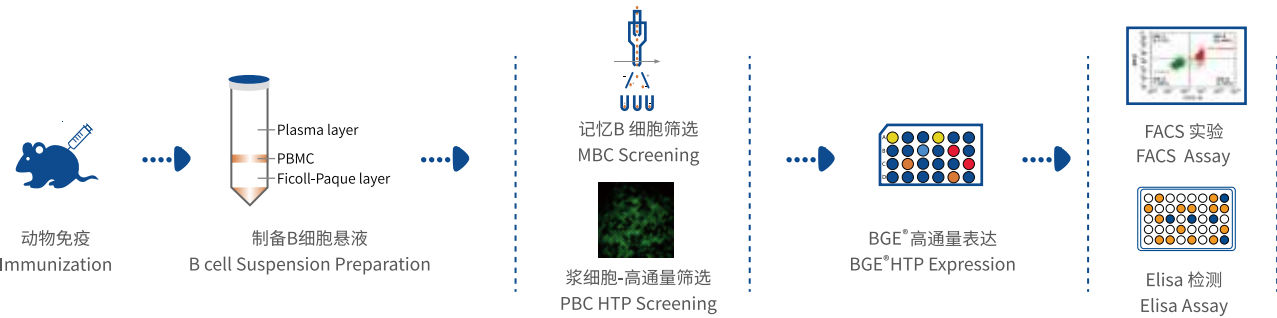
平台优势

 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





Recombinant Antibody Expression Service

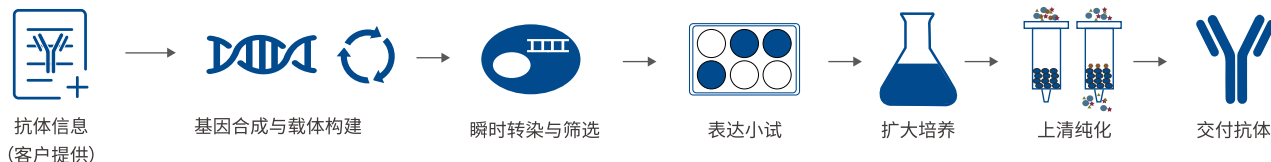
重组抗体表达

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、 $(\text{Fab}')_2$ 、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。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

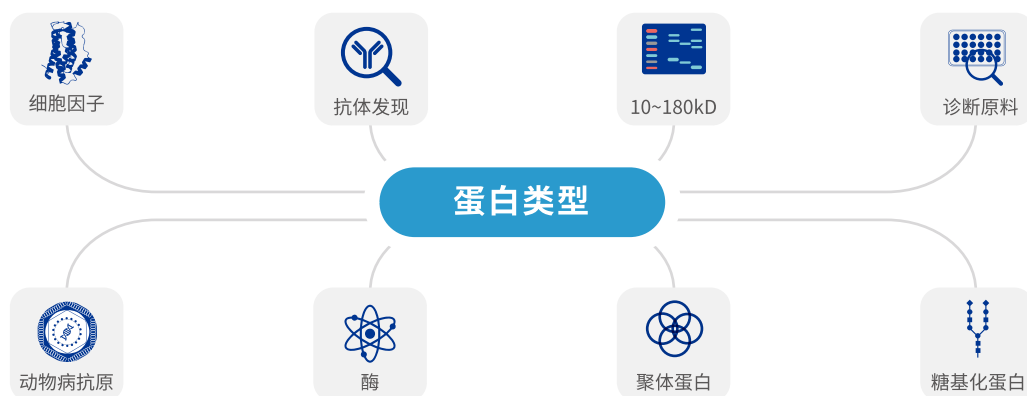


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

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。



4

Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

杂交瘤抗体基因测序

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。

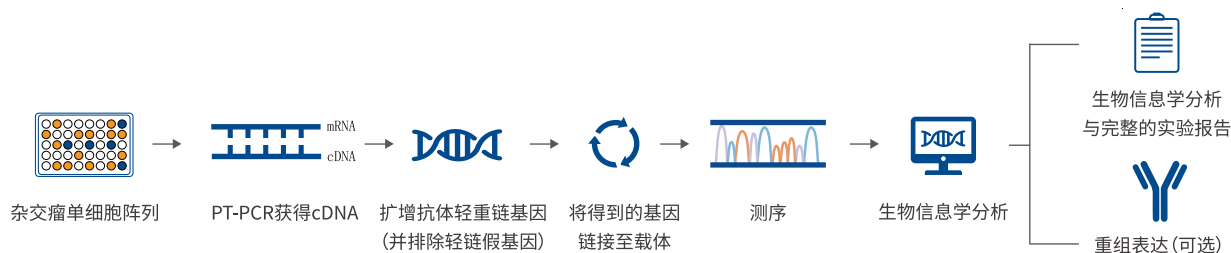
应用场景

- 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IgM和IgG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



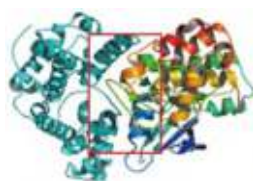
5

Biomolecular Interaction Analysis Service

分子间相互作用检测

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。



Antibody Humanization Service

抗体人源化

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



改造后的抗体人源化程度>90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

- 1 Antibody sequence confirmation
- 2 Human germline acceptor selection
- 3 CDR grafting
- 4 Back mutation
- 5 Mutation energy ranking
- 6 Antibody expression
- 7 Affinity ranking



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	是

服务流程



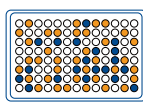
基因合成&质粒抽提



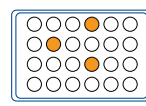
稳定转染



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