

## 瞬时表达实验

1. 案例概述	2
2. 序列分析	2
2.1. 蛋白质跨膜区域分析	2
2.2. 信号肽分析	2
3. 实验设计	3
4. 密码子优化	3
5. 基因合成与测序验证	4
6. 质粒酶切鉴定	4
7. 质粒抽提与质量测定	5
8. 瞬时转染	5
9. Ni-IDA 亲和层析纯化	6
10. 其他瞬时转染表达案例	7
11. 服务网址	7

## 1. 案例概述

客户在表达该聚体蛋白时遇到了转染效率低、蛋白表达水平低、纯化后的蛋白结构不完整，无法检测到四聚体等问题。公司接手该项目之后，对基因序列、表达载体与宿主细胞进行了研究和优化。我们查阅了大量文献资料，寻找类似蛋白的表达过程，摸索最佳的表达条件，最终表达纯化得到了目的蛋白。

## 2. 序列分析

### 2.1. 蛋白质跨膜区域分析

对氨基酸序列的跨膜区域进行分析预测，结果显示，该蛋白是一个多次跨膜蛋白，在蛋白表达时跨膜区会影响其表达，我们会去除跨膜区，添加 linker。

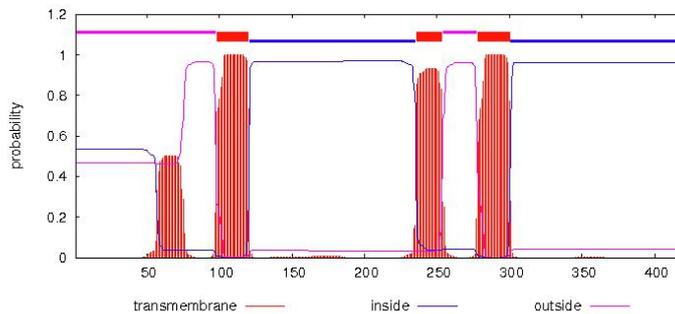


图 2-1 跨膜分析结果

### 2.2. 信号肽分析

蛋白在哺乳动物细胞中表达成熟后，信号肽会被切除。通过对客户提供的序列进行分析可知，该蛋白序列存在信号肽，我们将去除蛋白自身信号肽，采用德泰特有的较高分泌效率的信号肽。

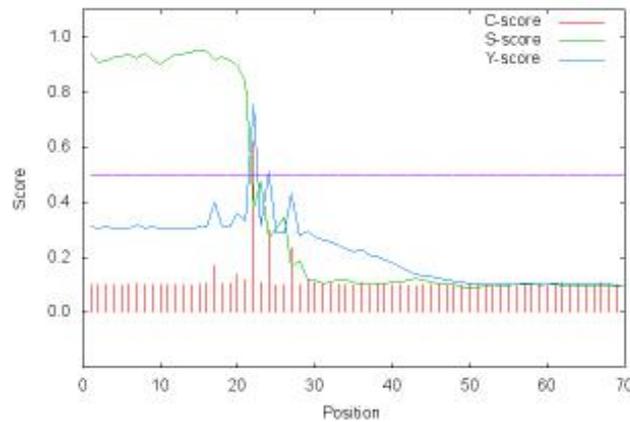


图 2-2 信号肽分析结果

### 3. 实验设计

采用德泰生物最新开发的密码子优化软件 MaxCodon™ 对目的基因序列进行优化，在 C 末端添加 His 标签，方便纯化。全基因合成之后，插入到表达载体 proEM 中，并通过酶切和测序确认目的基因正确连接到表达载体中，再转到克隆菌株 DH5a 中。培养克隆菌株扩增质粒后，抽提质粒，去除内毒素，转染哺乳动物细胞 CHO 与 HEK293。比较两者的表达量之后，选择更合适的宿主细胞。扩大培养，收集上清，通过亲和层析纯化得到目的蛋白。

### 4. 密码子优化

CAI (密码子适应指数)，可以用来预测外源基因的表达水平，优化 CAI 能够提高蛋白质表达效率。

对序列分析后可知，该蛋白氨基酸序列对应的密码子，与宿主细胞偏好使用的密码子相差较大，需要对基因进行优化。MaxCodon™ 以同义密码子替换作为手段，用使用频率更高的同义密码子替换掉稀有密码子。除 CAI 之外，mRNA 二级结构对蛋白质表达效率也有影响。我们的软件在提高 CAI (密码子适应指数) 同时，还对 mRNA 二级结构进行预测，减少 mRNA 二级结构数量 (详细过程见密码子优化案例)。

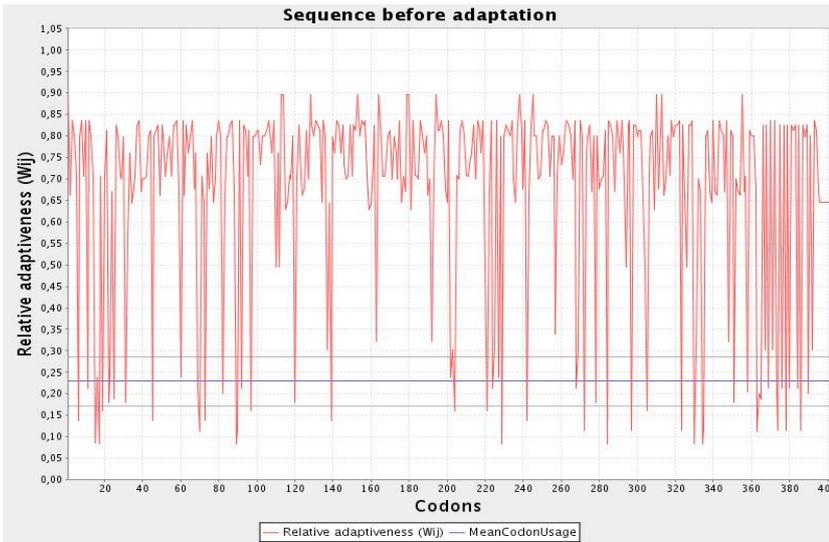


图 3-1 优化前序列的 CAI 分析结果

图 3-1 为优化前的序列，图中可以看出，目的基因与宿主细胞密码子使用偏性的符合程度较低，CAI 较低。

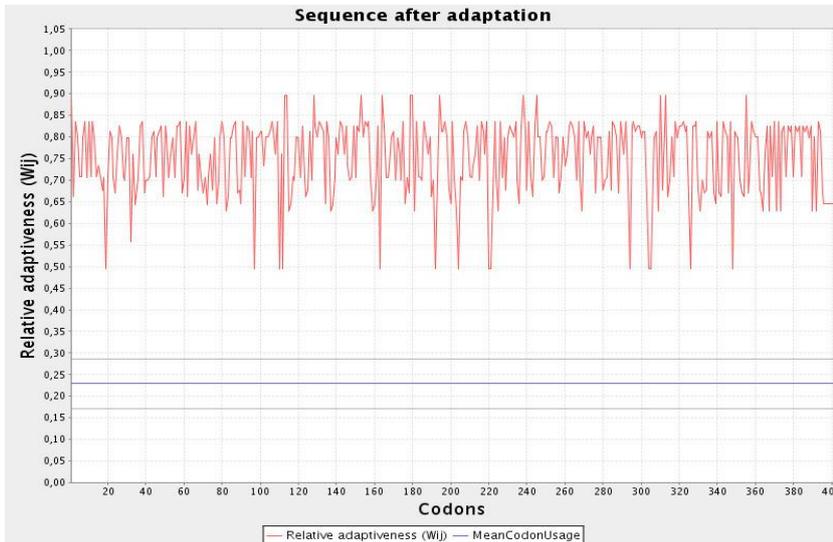


图 3-2 优化后序列的 CAI 分析结果

图 3-2 为优化后的序列，图中可以看出，目的基因与宿主细胞密码子使用偏性的符合程度明显提高，CAI 较高。

## 5. 基因合成与测序验证

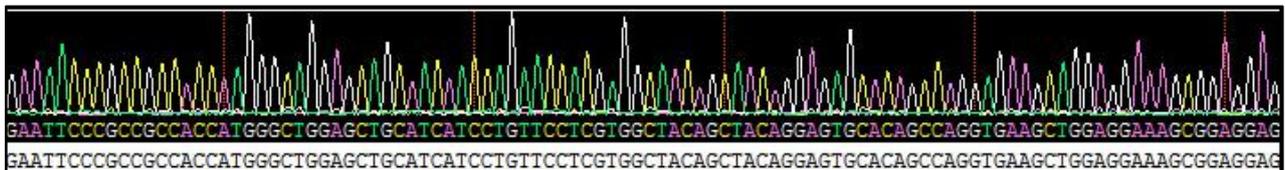


图 5-1 测序结果与目的序列比对

## 6. 质粒酶切鉴定

基因优化之后，构建质粒表达载体，酶切鉴定后可知，目的基因插入表达载体成功。

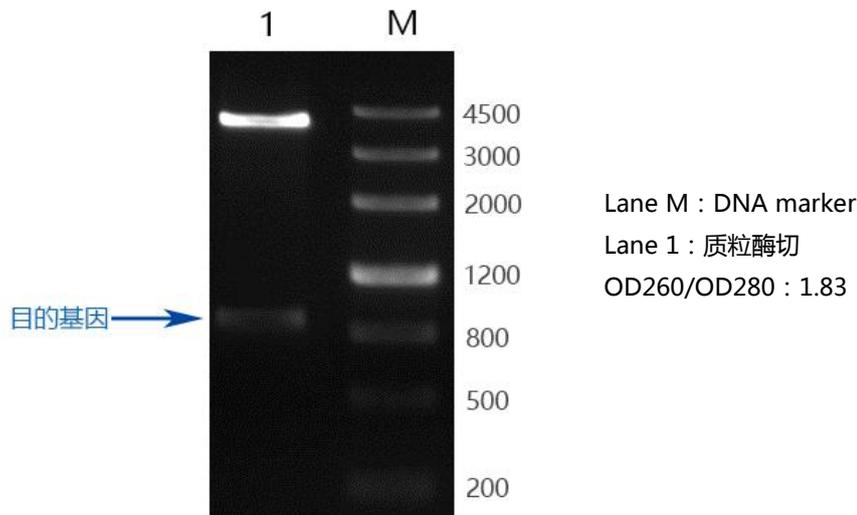


图 6-1 酶切验证结果

## 7. 质粒抽提与质量测定

以 DH5a 克隆菌株进行质粒扩增，然后抽提质粒。由于细菌中的内毒素会对哺乳动物细胞造成伤害，在质粒抽提时，需要去除内毒素。对抽提的质粒进行检测，确定质粒的检测结果显示达到转染的要求之后，再进行下一步转染实验。

检测内容	转染级质粒标准	质粒检测结果
A260/A280	1.8-2.0	1.92
内毒素	内毒素 < 0.05EU/μg	LAL 检测，内毒素 < 0.05EU/μg
无菌检测	无菌	LB 平板检测，无菌落

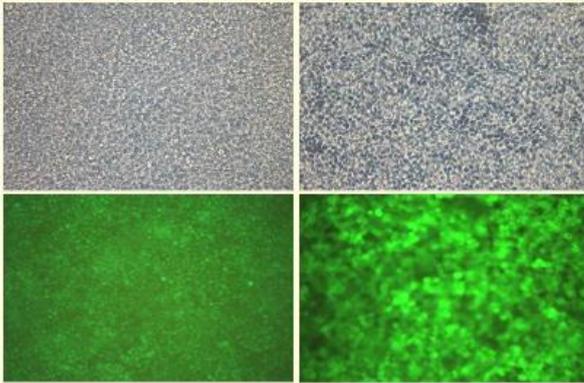
表 7-1 质粒检测结果

## 8. 瞬时转染

据客户反映，他在实验中采用的是化学试剂法，转染成功率比较低。查阅文献之后，我们找到同一家族蛋白的转染表达过程。之后调整转染过程中的各项条件与参数，提高转染成功率，并同时转染 CHO 与 HEK293 细胞，比较两者表达量，选择更合适的宿主细胞扩大培养。

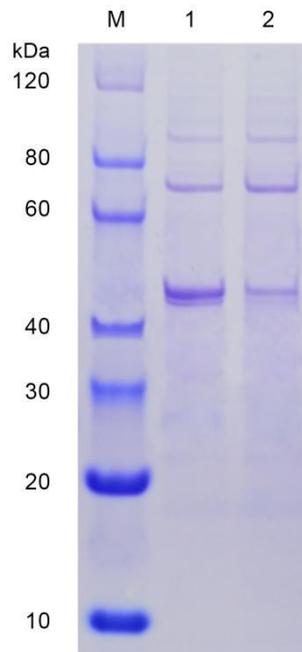
- 1) 转染前 2 天，置于培养箱中悬浮培养细胞。110rpm，37°C，5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。
- 2) 37°C 预热转染试剂 10~20min。DNA-转染试剂混合物加入待转染细胞中，置于培养箱中培养。

3) 转染后培养 4-6 天，取出细胞培养物，离心，收集上清或细胞。



在优化转染方法后，  
转染效率明显提高。

图 8-1 客户转染的细胞（左）与德泰转染的细胞（右）



Lane M: SDS-PAGE Protein Marker  
Lane 1: CHO 细胞培养上清  
Lane 2: HEK293 细胞培养上清

图 8-2 目的蛋白在 HEK293 与 CHO 细胞中的表达量对比，  
结果显示，目的蛋白在 CHO 细胞中表达量更高。

## 9. Ni-IDA 亲和层析纯化

1) 收集细胞培养液，4°C下 12500rpm 离心 10min，上清过滤透析。

2) 以 50 mM Tris( pH8.0 )，300 mM NaCl，50mM Imidazole 缓冲液平衡 Ni-IDA 亲和层析柱。

3) 上样后用不同浓度咪唑的平衡缓冲液洗脱目标蛋白，并收集每个洗脱组分进行 SDS-PAGE 分析检测。

4) 查阅文献可知该蛋白活性结构以四聚体形式存在，层析过柱之后，在还原和非还原状态下对上清洗脱组分

进行电泳，电泳结果（图 9-1）显示细胞培养上清中确实存在四聚体，和文献描述一致。

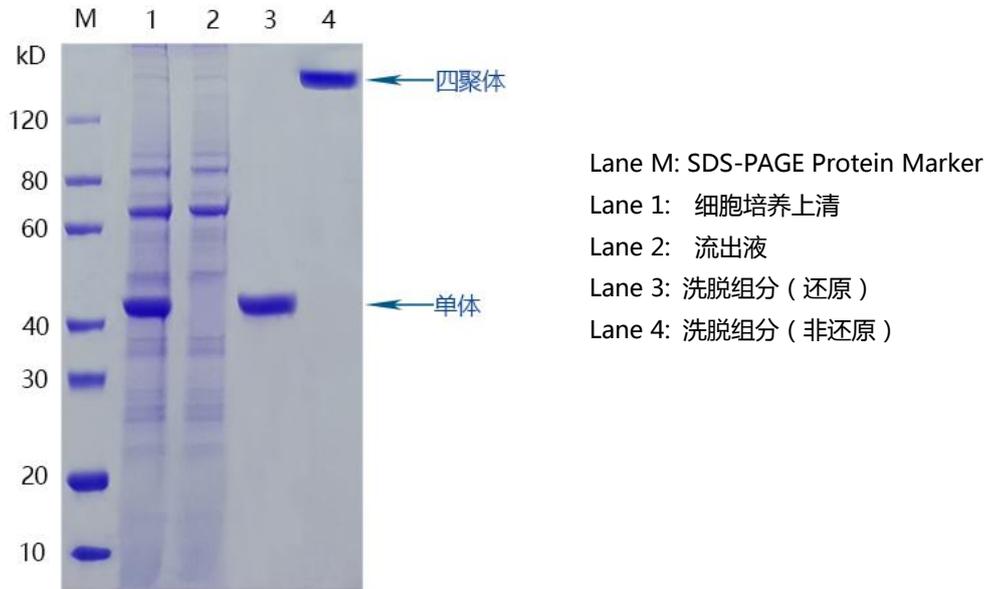


图 9-1 亲和层析电泳结果

## 10. 其他瞬时转染表达案例

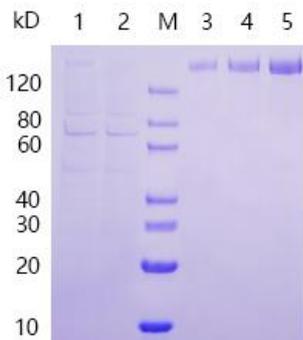


图 10-1 较大分子量(165kD)蛋白表达纯化

Lane M: SDS-PAGE Protein Marker  
 Lane 1: 细胞培养上清  
 Lane 2: 流出液  
 Lane 3-5: 洗脱组分

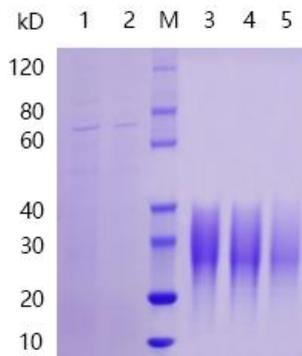


图 10-2 糖基化等修饰蛋白表达纯化

Lane M: SDS-PAGE Protein Marker  
 Lane 1: 细胞培养上清  
 Lane 2: 流出液  
 Lane 3-5: 洗脱组分

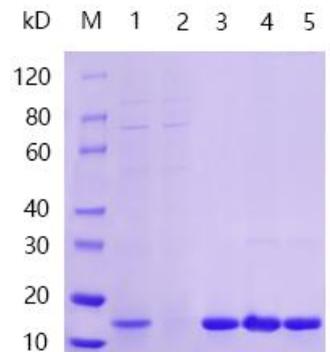


图 10-3 小分子量蛋白(16kD)表达纯化

Lane M: SDS-PAGE Protein Marker  
 Lane 1: 细胞培养上清  
 Lane 2: 流出液  
 Lane 3-5: 洗脱组分

## 11. 服务网址

[www.detaibio.com/mammalian-cell-transient.html](http://www.detaibio.com/mammalian-cell-transient.html)