

基于蛋白水平的研究

在几乎所有的生命活动中，蛋白质都扮演中着重要角色。它们催化生化反应，维持细胞的结构与稳定，调控关键分子的积累、利用及储存，参与协调生长与发育过程。而参与植物生长发育调控的蛋白质的功能与蛋白质结构、组成、时间空间分布息息相关。

本章介绍了蛋白质样品的制备，包括植物总蛋白的提取，利用原核表达系统获得植物蛋白进行体外功能研究的方法。此外介绍了几种研究植物蛋白质定位的方法，包括瞬时检测和稳定检测的方法。希望通过本章的内容，帮助同学们掌握蛋白质样品制备、抗体制备和蛋白亚细胞定位的主要流程和基本方法。

实验 12 植物蛋白的原核表达与纯化

【实验背景与原理】

在植物发育生物学研究过程中，很多情况下需要对研究的蛋白进行功能和结构的分析，这个时候就需要对目的蛋白进行体外表达和纯化。大肠杆菌系统由于其在遗传学、生物化学和分子生物学等方面已充分被人们所了解，因此大肠杆菌系统成为表达许多植物蛋白质的首选表达系统。当然大肠杆菌并非是万能的宿主，有些蛋白质需要经过翻译后修饰（如糖基化）才能具有完全的生物活性，表达这些蛋白质最好选择真核细胞作为宿主。因此在着手表达目的蛋白之前，首先要明确最终目标，根据实验需要选择合适的宿主 - 载体 - 纯化系统。

如果需要大规模的获得体外纯化的蛋白质，单细胞系统是首选，因为在实验速度和可操作性上，单细胞系统都存在一定的优势。选择表达系统主要基于如下两种考虑：①蛋白的天然性质（是否存在翻译后修饰？疏水区段的比例以及是否对宿主存在毒害性）；②纯化实验的目的（下游实验是否需要大量的纯化蛋白？纯化蛋白是否需要保持生物活性？翻译后修饰是否是后续实验的必要条件？）大肠杆菌系统的优势在于：①能够获得大量的目的蛋白；②非常成熟和完善的纯化体系；③实验简单、便捷且耗时较短；④载体容易操控。同时大肠杆菌系统也存在一些缺陷：①较难表达一些分子量较大的蛋白（大于 50kDa）；②没有翻译后修饰系统；③只有一部分蛋白质可以保持天然活性；④很多蛋白以包涵体形式表达，需要复性。本实验以大肠杆菌系统为例，介绍了利用两种标签系统 pET 系统（组氨酸标签）和 pGEX 系统（GST 标签）异源表达和纯化植物蛋白质的方法。

【实验目的】

通过本实验学会利用大肠杆菌系统进行植物蛋白质异源表达和纯化的方法。

【实验材料、试剂及器材】

1. 表达菌株

E.coli DH5 α , *E.coli* BL21 (DE3), *E.coli* Rosetta (DE3) (注1)。

2. 载体

(1) 克隆用载体: pMD18-T-simple 或类似载体。

(2) 原核表达载体: pGEX 系列载体 (纯化标签为 GST)。

(3) 原核表达载体: pET 系列载体 (纯化标签为组氨酸标签)。

3. 克隆相关试剂

ExTaq (Takara 公司), 核酸内切酶, 载体。

4. 蛋白 SDS-PAGE 电泳相关试剂

(1) 30% (w/v) Acr/Bis (30% 胶储液): 称取 29g 丙烯酰胺 (Acr) 和 1g 甲叉双丙烯酰胺 (Bis), 加入 60mL 去离子水充分搅拌溶解, 用去离子水定容至 100mL, 过滤除菌, 棕色瓶 4℃ 保存, 使用时恢复至室温且无沉淀。也可购买商用的 30% Acr/Bis 胶储液。

(2) 分离胶缓冲液 (1.5mol/L Tris-HCl, pH 8.8): 称取 45.43g Tris-base, 溶解于 200mL 去离子水中, 用浓盐酸调 pH 至 8.8, 最后用去离子水定容至 250mL, 高温灭菌后 4℃ 保存。

(3) 浓缩胶缓冲液 (1.0mol/L Tris-HCl, pH 6.8): 称取 24.23g Tris-base, 溶解于 200mL 去离子水中, 用浓盐酸调 pH 至 6.8, 最后用去离子水定容至 250mL, 高温灭菌后 4℃ 保存。

(4) 10% (w/v) SDS: 称取 10g SDS, 加入 80mL 去离子水, 于 68℃ 加热溶解, 用浓盐酸调节 pH 至 7.2, 定容至 100mL, 室温保存。

(5) 10% (w/v) 过硫酸铵 (AP): 称取 0.1g 过硫酸铵, 溶解于 1mL 去离子水中, 配每一组新胶时新鲜配制。

(6) 四甲基乙二胺 (TEMED): 4℃ 保存。

(7) 5×Tris-Glycine 电泳缓冲液: 称取 15.1g Tris-base, 94g 甘氨酸和 5.0g SDS, 溶解于 1000mL 去离子水中, 不需要调节 pH 值, 4℃ 保存, 使用时用去离子水稀释为 1× 电泳缓冲液。

(8) 4×SDS-PAGE 上样缓冲液: 称取 4g SDS, 0.032g 溴酚蓝, 3.085g DTT, 溶解于 40mL 去离子水中, 再依次加入 4mL 1mol/L Tris-HCl (pH 6.8) 和 40mL 甘油, 最后定容至 100mL, 分装为小份 (1mL/份) 于 4℃ 保存。

(9) 考马斯亮蓝 R-250 染色液: 称取 1g 考马斯亮蓝 R-250, 加入 250mL 异丙醇搅拌溶解, 再依次加入 100mL 冰醋酸, 定容至 1000mL, 过滤除去颗粒物后, 室温保存。

(10) 考马斯亮蓝染色脱色液: 量取 100mL 冰醋酸和 50mL 乙醇, 定容至 1000mL, 充分混合后使用。

5. 大肠杆菌培养相关试剂

(1) LB 培养基: 10g 蛋白胨, 5g 酵母提取物, 5g 氯化钠, 溶解于 900mL 去离子水中, 用 1mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0, 定容至 1000mL, 高压灭菌后室温保存。

(2) 2×YT 培养基: 16g 蛋白胨, 10g 酵母提取物, 5g 氯化钠, 溶解于 900mL 去离子水中, 用 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.0, 定容至 1000mL, 高压灭菌后室温保存。

(3) 卡那霉素 (Km) (50mg/mL): 称取 5g 氨苄青霉素溶解于 25mL 去离子水中, 用 0.22μm 滤膜过滤除菌, 分装为 1mL/份, -20℃保存。

(4) 氨苄青霉素 (Amp) (100mg/mL): 称取 5g 氨苄青霉素溶解于 50mL 去离子水中, 用 0.22μm 滤膜过滤除菌, 分装为 1mL/份, -20℃保存。

6. GST 标签纯化相关试剂

(1) 10×PBS (pH 7.4, 7.6, 7.8, 8.0): 称取 80g NaCl, 2g KCl, 14.2g Na₂HPO₄ 和 2.7g KH₂PO₄, 溶解于 800mL 去离子水, 充分搅拌溶解, 根据实验所需用浓盐酸调节 pH 至 7.4, 7.6, 7.8 或 8.0, 定容至 1000mL, 高压灭菌后室温保存。

(2) 1×PBS: 将 10×PBS 用去离子水稀释为 1×PBS, 调节 pH 至 7.4, 高压灭菌后 4℃保存。

(3) IPTG (1mol/L): 称取 12g IPTG, 溶解于 50mL 去离子水中, 用 0.22μm 滤膜过滤除菌, 分装为 1mL/份, -20℃保存。

(4) 6mol/L 盐酸胍: 称取 32.5g 盐酸胍, 溶解于 30mL 去离子水中, 定容至 57mL, 4℃保存。

(5) 20% 和 70% 乙醇: 用无水乙醇配制 20% 和 70% 乙醇。

(6) GST 标签洗脱缓冲液: 50mmol/L Tris-HCl, 10mmol/L 还原型谷胱甘肽, 调节 pH 至 8.0, 0.22μm 滤膜过滤除菌, 分装为 1mL/份, -20℃保存。不可反复冻融。

(7) 0.1mol/L DTT (二硫苏糖醇): 称取 1.54g 无水 DTT 溶于适量去离子水, 充分溶解后, 定容至 10mL, 小份分装, 置于 -20℃避光储存。

(8) 20% SKL (N-lauroylsarcosine sodium salt, N-12 烷基肌氨酸钠): 称取 10g SKL 溶于适量去离子水, 充分搅拌溶解后, 定容至 50mL, 置于玻璃试剂瓶, 室温储存。

(9) 20% DOC (Sodium Deoxycholate, 脱氧胆酸钠): 称取 10g DOC 溶于适量去离子水中, 充分搅拌溶解后, 定容至 50mL, 置于玻璃试剂瓶, 室温储存 (注 2)。

(10) 0.1% Triton X-100。

(11) 缓冲液 A: 1×PBS, 含有 0.1% Triton X-100 和 0.1 mmol/L DTT(使用前新鲜加入)。

(12) GST 标签包涵体洗涤缓冲液: 缓冲液 A, 含有 2% DOC。

(13) GST 标签包涵体裂解缓冲液: 缓冲液 A, 含有 0.3% SKL。

(14) 复性缓冲液: 缓冲液 A。

(15) 溶菌酶 (20KU/mg)。

(16) 全能核酸酶 (Benzonase, 2U/μL)。

(17) 蛋白酶抑制剂混合物 (100×) (注 3)。

(18) GST 柱恢复缓冲液 1: 0.5mol/L NaCl, 0.1mol/L Tris-HCl, (pH 8.5)。

(19) GST 柱恢复缓冲液 2: 0.5mol/L NaCl, 0.1mol/L Tris-HCl, (pH 4.5)。

(20) 碳酸氢钠。

(21) 0.5mol/L EDTA (pH 8.0)。

(22) 谷胱甘肽琼脂糖 4B。

7. 组氨酸标签纯化相关试剂

(1) IPTG (1mol/L)。

(2) Tris-HCl (pH 7.9): 称取 12.14g Tris-base, 溶解于去离子水中, 用浓盐酸调节 pH 至 7.9, 定容至 100mL, 高压灭菌后室温保存。

(3) 咪唑 (1mol/L): 称取 6.81g 咪唑, 溶解于去离子水中, 定容至 100mL, 用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌后室温保存。

(4) 5mol/L NaCl: 称取 29.22g 氯化钠, 溶解于 100mL 去离子水中, 高压灭菌后 4℃保存。

(5) 溶菌酶 (20KU/mg)。

(6) 全能核酸酶 (Benzonase, 2U/ μ L)。

(7) 盐酸胍。

(8) 尿素。

(9) 10 $\times$ PBS。

(10) 1 $\times$ PBS。

(11) 组氨酸标签结合缓冲液: 20mmol/L Tris-HCl (pH 7.9), 10mmol/L 咪唑, 500mmol/L NaCl。

(12) 组氨酸标签洗脱缓冲液: 20mmol/L Tris-HCl (pH 7.9), 40~500mmol/L 咪唑, 500mmol/L NaCl。

(13) 组氨酸标签包涵体结合缓冲液 (盐酸胍结合缓冲液): 20mmol/L Tris-HCl (pH 7.9), 500mmol/L NaCl, 6mol/L 盐酸胍。

(14) 组氨酸标签包涵体结合缓冲液 (尿素结合缓冲液): 20mmol/L Tris-HCl (pH 7.9), 500mmol/L NaCl, 8mol/L 尿素。

(15) 组氨酸标签包涵体洗脱缓冲液 (盐酸胍洗脱缓冲液): 20mmol/L Tris-HCl (pH 7.9), 500mmol/L NaCl, 40~500mmol/L 咪唑, 6mol/L 盐酸胍。

(16) 组氨酸标签包涵体洗脱缓冲液 (尿素洗脱缓冲液): 20mmol/L Tris-HCl (pH 7.9), 500mmol/L NaCl, 40~500mmol/L 咪唑, 8mol/L 尿素。

(17) 蛋白酶抑制剂混合物 (100 $\times$) (注3)。

(18) Ni-Agarose: CL-6B 琼脂糖。

8. 标签切除相关试剂

(1) 凝血酶液: 溶解 500 个单位的凝血酶于 4℃预冷的 0.5mL 1 $\times$ PBS, 混匀后小份分装, 于 -80℃保存备用。

(2) Hitrap Benzamidine 4B: 货号 17-5144-01, 购于 GE healthcare 公司。

9. 实验器材

不同规格试管, 不同规格离心管, 0.22 μ m 滤膜, 层析柱, PALL 超滤离心管, 透析袋, 不同规格移液器及吸头, 不同规格烧杯, 不同规格三角瓶, 恒温水平摇床, 恒温培养箱, 蛋白垂直电泳仪, 超声破碎仪, 高速冷冻离心机, 水平摇床, 真空冷冻干燥仪。

【实验方法与步骤】

1. 实验前分析

- (1) 翻译起始位点（注 4）。
- (2) 目的蛋白质的大小（注 5）。
- (3) 亲疏水性（注 6）。
- (4) 可溶性（注 6）。
- (5) 蛋白酶切位点（注 7）。

2. 原核表达载体构建（注 8）

(1) 分析目的序列酶切位点，选择载体多克隆位点区合适的酶切位点，根据选定的酶切位点设计引物。

(2) 利用 PCR 克隆出目的片段后，割胶回收或者纯化后，目的片段连接入测序载体 pMD18-T-simple，测序。

(3) 测序正确的目的片段和原核表达载体，用相同的核酸内切酶进行双酶切，回收骨架载体和目的片段后，将目的片段与骨架载体连接，形成重组原核表达载体（注 9）。

3. 蛋白的 SDS-PAGE 电泳（详细操作参考实验 15）

1) SDS-PAGE 电泳凝胶的配制

按照表 12-1 和表 12-2 配制 SDS-PAGE 凝胶。

表 12-1 SDS-PAGE 凝胶电泳 5% 浓缩胶配方

组分	总体积（5mL）	总体积（6mL）	总体积（8mL）
去离子水	3.4	4.1	5.5
30% 胶储液	0.83	1.0	1.3
1mol/L Tris-HCl（pH 6.8）	0.63	0.75	1.0
10% SDS	0.05	0.06	0.08
10% AP	0.05	0.06	0.08
TEMED	0.005	0.006	0.008

表 12-2 SDS-PAGE 凝胶电泳 12% 分离胶配方

组分	总体积（20mL）	总体积（25mL）	总体积（30mL）
去离子水	6.6	8.2	9.9
30% 胶储液	8	10	12
1.5mol/L Tris-HCl（pH 8.8）	5	6.3	7.5
10% SDS	0.2	0.25	0.3
10% AP	0.2	0.25	0.3
TEMED	0.008	0.01	0.012

2) 蛋白质的 SDS-PAGE 电泳分离

(1) 蛋白上样: 取 5~10 μ g 待分离的细菌总蛋白, 加入终浓度 1 $\times$ 蛋白上样缓冲液, 混匀, 盖紧, 100 $^{\circ}$ C 干热浴处理 5~10min, 以 12000r/min, 离心 1min, 吸取 10 μ L 上样。

(2) 电泳分离: 凝胶在室温, 1 $\times$ 电泳缓冲液, 6V/cm 恒定电压下进行电泳, 直到溴酚蓝指示线完全进入分离胶, 然后把电压调至 12V/cm 恒定电压继续电泳, 直到溴酚蓝指示线接近凝胶底部。

(3) 成像: 电泳完成后将凝胶取出, 用双蒸水冲洗几次, 然后在考马斯亮 R-250 染色液中染色 2~3h, 用脱色液脱色 4~5 次。将脱色后的凝胶用加有 2% 甘油的脱色液浸泡 1h, 最后进行凝胶成像。

4. 重组蛋白的体外诱导与纯化条件摸索

在大量纯化目的蛋白前, 需要对诱导条件和纯化条件进行摸索, 包括诱导 IPTG 的最适浓度、培养的最优温度、培养最优时间、组氨酸标签洗脱咪唑最佳浓度等。

1) 诱导最佳温度摸索实验

(1) 过夜培养含有重组质粒 pGEX-A 或 pET-A (A 为目的基因 / 目的蛋白) 的 BL21 大肠杆菌, 按 1 : 100 的比例接菌至 5mL 2 $\times$ YT 培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 以 220r/min, 摇菌培养至 OD600 为 0.6 左右。

(2) 加入 0.1mmol/L IPTG, 筛选最适诱导温度, 选择 28 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C 或 37 $^{\circ}$ C, 以 220r/min, 诱导 2h, SDS-PAGE 检测蛋白表达情况, 确定最佳表达温度。

2) 诱导最佳 IPTG 浓度摸索实验

(1) 过夜培养含有重组质粒 pGEX-A 或 pET-A (A 为目的基因 / 目的蛋白) 的 BL21 大肠杆菌, 按 1 : 100 的比例接菌至 5mL 2 $\times$ YT 培养基中, 根据优化的诱导温度, 以 220r/min, 摇菌至 OD600 为 0.6 左右。

(2) 加入不同浓度的 IPTG (0、0.05、0.1~1mmol/L) 以筛选最适 IPTG 诱导浓度, 以 220r/min, 诱导 2h, SDS-PAGE 检测蛋白表达情况, 确定最佳诱导 IPTG 浓度。

3) 诱导最佳时间摸索实验

(1) 过夜培养含有重组质粒 pGEX-A 或 pET-A (A 为目的基因 / 目的蛋白) 的 BL21 大肠杆菌, 按 1 : 100 的比例接菌至 5mL 2 $\times$ YT 培养基中, 根据优化的诱导温度, 以 220r/min, 摇菌至 OD600 为 0.6 左右。

(2) 根据最佳诱导浓度加入 IPTG, 筛选最适诱导时间, 以 30min 为界, 220r/min, 诱导培养 0.5~7h, SDS-PAGE 检测蛋白表达情况, 确定蛋白表达最佳诱导时间。

5. 重组蛋白的大量纯化

1) 可溶性 GST 标签蛋白的大量纯化

(1) 重组蛋白的表达和细菌菌体收集。根据最优的诱导条件, 大量诱导表达蛋白, 进行纯化。过夜培养含有重组质粒 pGEX-A (A 为目的基因 / 目的蛋白) 的 BL21 大肠杆菌, 按 1 : 100 的比例接菌至 500mL 2 $\times$ YT 培养基中, 按照最优诱导温度, 以 220r/min, 培养至 OD600 约为 0.6, 加入最优诱导浓度的 IPTG, 按照最优诱导时间, 以 220r/min, 振荡培养。在 4 $^{\circ}$ C 条件下, 以 5000g 离心 30min, 弃上清液, 收集菌体。用 1 $\times$ PBS 缓冲液重悬细菌沉淀, 4 $^{\circ}$ C, 以 5000g 离心 30min, 弃上清液, 收集菌体。沉淀可以直接用于后续裂解或者保存

于 -80°C 。

(2) 细胞裂解。①超声法：每 500mL 菌液离心后菌体加入预冷的 200mL $1\times\text{PBS}$ (pH 7.4, 含 2mL $100\times$ 蛋白酶抑制剂混合物) 重悬, 置于冰上进行超声波破碎 (注 10), 待菌液澄清后 (约 20min, 在显微镜下观察到绝大多数细胞破裂), 在 4°C 条件下, 以 $5000g$ 离心 30min, 将上清液转移至干净烧杯中, 置于冰上备用。②溶菌酶法：每 500mL 菌液离心后菌体加入预冷的 200mL 新鲜配制的细胞裂解液 (每 200mL 裂解液中含有 30mg 溶菌酶, 2mL $100\times$ 蛋白酶抑制剂混合物和 $200\mu\text{L}$ Benzonase), 重悬细菌沉淀后, 置于冰上放置 30~60min, 获得细菌裂解物。裂解完成后, 4°C , 以 $5000g$ 离心 30min, 将上清液转移至干净烧杯中, 置于冰上备用。

(3) 层析柱的制备。摇晃将谷胱甘肽琼脂糖 4B 介质充分混匀后, 取适量加入到预放了一片筛板的层析柱中 (注 11)。加入 10mL 预冷的 $1\times\text{PBS}$ 缓冲液洗涤, 轻轻振荡混匀, 于 4°C 静置 10min, 打开层析柱下方的盖子, 使 PBS 洗涤液从层析柱的中流出 (由于层析柱底部有一层筛板, 液体可以通过, 而谷胱甘肽琼脂糖 4B 颗粒不能通过), 重复洗涤 2~3 次。

(4) 可溶性 GST 标签蛋白的过柱吸附。层析柱盖上盖子, 将细胞裂解后离心获得的上清液 (含可溶性 GST 标签蛋白) 上柱, 轻轻摇晃混匀, 于 4°C 静置 60min 至过夜 (注 12)。打开层析柱盖子, 让重力使上柱液自然流出, 收集并保存穿透液 (含未吸附的可溶性 GST 标签蛋白和其他可溶性杂蛋白), 用于 SDS-PAGE 电泳 (注 13)。

(5) 可溶性 GST 标签蛋白的洗脱。加入 10mL 预冷的 $1\times\text{PBS}$ 溶液, 轻轻振荡混匀, 于 4°C 静置 10min, 让残留在层析柱上的未吸附蛋白和杂蛋白自然流出, 以洗脱杂蛋白 (注 14)。重复洗脱 4~6 次。收集洗脱液 (含杂蛋白), 用于 SDS-PAGE 电泳。层析柱盖上盖子, 在层析柱中加入 1mL GST 标签洗脱缓冲液, 轻轻混匀, 于 4°C 静置 10min, 打开盖子, 收集从层析柱中流出的穿透液, 即为可溶性 GST 标签蛋白。测定浓度并且用 SDS-PAGE 电泳检测。

(6) 可溶性 GST 标签蛋白的浓缩与干燥。选择适宜容量的 PALL 超滤离心管, 在 4°C 条件下以 $13000\text{r}/\text{min}$ 离心 30min, 即得浓缩的可溶性 GST 标签蛋白。可以选择用真空冷冻干燥仪将蛋白干燥为干粉, 测定浓度后, 置于 -80°C 保存, 也可以直接将浓缩后的蛋白测定浓度后, 置于 -80°C 保存。

2) 包涵体 GST 标签蛋白的过柱纯化 (注 15)

(1) 重组蛋白的表达和细菌菌体收集。根据最优的诱导条件, 大量诱导表达蛋白, 进行纯化。过夜培养含有重组质粒 pGEX-A (A 为目的基因/目的蛋白) 的 BL21 大肠杆菌, 按 1:100 的比例接菌至 500mL $2\times\text{YT}$ 培养基中, 按照最优诱导温度, 以 $220\text{r}/\text{min}$, 培养至 OD600 约为 0.6, 加入最优诱导浓度的 IPTG, 按照最优诱导时间, 以 $220\text{r}/\text{min}$, 振荡培养。 4°C , $5000g$ 离心 30min, 弃上清液, 收集菌体。用 $1\times\text{PBS}$ 缓冲液重悬细菌沉淀, 4°C , $5000g$ 离心 30min, 弃上清液, 收集菌体。沉淀可以直接用于后续实验或者保存于 -80°C 。

(2) 包涵体的分离。每 100mL 细菌培养物的沉淀菌体中加入 5mL 缓冲液 A (注 16), 充分振荡悬浮菌体, 于超声破碎仪上进行细胞破碎 (一般选 1~10K 频率处理 15min, 每次 10s, 间隔 10s)。细胞破碎液于 4°C , 以 $12000\text{r}/\text{min}$, 离心 30min, 弃上清液。

(3) 包涵体的纯化。加入 10mL GST 标签包涵体洗涤液, 充分振荡悬浮沉淀, 于 4°C , $12000\text{r}/\text{min}$, 离心 30min, 弃上清液。重复洗涤 2 次。离心后获得的包涵体溶解于 10mL GST 标签包涵体裂解缓冲液, 轻轻振荡, 使包涵体缓慢溶解, 然后于 4°C 静置 30min。溶解的 GST 包涵体蛋白悬液于 4°C , 以 $12000\text{r}/\text{min}$, 离心 30min, 取上清液。

(4) 透析袋活化(注17)。将透析袋剪成适当长度(10~20cm)的小段。在含有2%(W/V)碳酸氢钠和1mmol/L EDTA(pH 8.0)的溶液中将透析袋煮10min。用去离子水彻底漂洗4~6次。然后在含有1mmol/L EDTA(pH 8.0)的溶液中煮10min。透析袋冷却后,置于含有1mmol/L EDTA(pH 8.0)的溶液中,4℃保存(注18)。使用前用去离子水将透析袋内外冲洗干净,备用。

(5) 包涵体蛋白的复性。溶解蛋白上清液用1×PBS稀释10倍,装入透析袋,于4℃,1000mL复性缓冲液中充分搅拌透析。透析8h后,更换新的缓冲液冲洗,重复3~4次。

(6) 包涵体蛋白的纯化。经透析复性后的GST标签蛋白通过谷胱甘肽琼脂糖4B介质进行纯化,具体步骤参见“可溶性GST标签蛋白的大量纯化”。

3) 谷胱甘肽琼脂糖4B介质柱的恢复。

用3倍体积的6mol/L盐酸胍处理柱子10min,用3倍体积的超纯水处理柱子10min,用3倍体积的GST柱恢复缓冲液1处理柱子10min,用3倍体积的GST柱恢复缓冲液2处理柱子10min;重复2次。最后用3倍体积的超纯水处理柱子3次,3倍体积的1×PBS缓冲液处理2次。待上述处理液流出后,盖上层析柱盖子,加入3倍体积的20%乙醇。层析柱置于4℃保存(注19)。

4) 可溶性组氨酸标签蛋白的大量纯化

(1) 重组蛋白的表达和细菌菌体收集。根据最优的诱导条件,大量诱导表达蛋白,进行纯化。过夜培养含有重组质粒pET-A(A为目的基因/目的蛋白)的BL21大肠杆菌,按1:100的比例接菌至500mL 2×YT培养基中,按照最优诱导温度,以220r/min,培养至OD600约为0.6,加入最优诱导浓度的IPTG,按照最优诱导时间,以220r/min,振荡培养。4℃,5000g离心30min,弃上清液,收集菌体。用1×PBS缓冲液重悬细菌沉淀,4℃,5000g离心30min,弃上清液,收集菌体。沉淀可以直接用于后续裂解或者于-80℃保存。

(2) 细胞裂解。参见可溶性GST标签蛋白的大量纯化的细胞裂解步骤。

(3) 层析柱的制备。摇晃将CL-6B琼脂糖介质充分混匀后,取适量加入到预放了一片筛板的层析柱中(注20)。加入预冷的5倍柱体积去离子水洗涤(注19),轻轻振荡混匀,于4℃静置10min,打开层析柱下方的盖子,使洗涤液从层析柱中流出(由于层析柱底部有一层筛板,液体可以通过,而CL-6B琼脂糖介质颗粒不能通过),重复洗涤2~3次。用5倍柱体积的新鲜配制组氨酸标签结合缓冲液洗涤,重复3次。

(4) 可溶性组氨酸标签蛋白的过柱吸附。层析柱盖上盖子,将细胞裂解后离心获得的上清液(含可溶性组氨酸标签蛋白)上柱,轻轻摇晃混匀,于4℃静置60min至过夜(注12)。打开层析柱盖子,让重力使上柱液自然流出,收集并保存穿透液(含未吸附的可溶性组氨酸标签蛋白和其他可溶性杂蛋白),用于SDS-PAGE电泳(注13)。

(5) 可溶性组氨酸标签蛋白的洗脱。层析柱中加入10倍柱体积的组氨酸标签结合缓冲液轻轻振荡混匀,于4℃静置10min,让残留在层析柱上的未吸附蛋白和杂蛋白自然流出,以洗脱杂蛋白。重复洗脱4~6次。收集洗脱液(含杂蛋白),用于SDS-PAGE电泳。配制梯度咪唑浓度洗脱缓冲液,按从低到高的顺序洗脱并收集流出液,SDS-PAGE电泳检测组氨酸标签蛋白最佳洗脱咪唑浓度(注21)。根据最优洗脱咪唑浓度进行大量纯化。

(6) 可溶性组氨酸标签蛋白的浓缩与干燥。选择适宜容量的PALL超滤离心管,4℃,以13000r/min离心30min,即得浓缩的可溶性组氨酸标签蛋白。可以选择用真空冷冻干燥仪将蛋白干燥为干粉,测定浓度后,置于-80℃保存,也可以直接将浓缩后的蛋白测定浓度后,

置于 -80°C 保存。

5) 包涵体组氨酸标签蛋白的大量纯化

(1) 重组蛋白的表达和细菌菌体收集。根据最优的诱导条件, 大量诱导表达蛋白, 进行纯化。过夜培养含有重组质粒 pET-A (A 为目的基因/目的蛋白) 的 BL21 大肠杆菌, 按 1:100 的比例接菌至 500mL $2\times\text{YT}$ 培养基中, 按照最优诱导温度, 以 220r/min, 培养至 OD600 约为 0.6, 加入最优诱导浓度的 IPTG, 按照最优诱导时间, 以 220r/min, 振荡培养。4 $^{\circ}\text{C}$, 以 5000g 离心 30min, 弃上清液, 收集菌体。用 $1\times\text{PBS}$ 缓冲液重悬细菌沉淀, 4 $^{\circ}\text{C}$, 以 5000g 离心 30min, 弃上清液, 收集菌体。沉淀可以直接用于后续实验或者于 -80°C 保存。

(2) 包涵体的分离。每 20mL 细菌培养物沉淀重悬于 1~3mL 组氨酸标签包涵体结合缓冲液 (注 22)。冰浴 60min, 使包涵体溶解, 期间可轻柔摇晃几次。4 $^{\circ}\text{C}$, 以 12000r/min, 离心 30min, 取上清液 (含溶解的组氨酸标签蛋白), 沉淀为未溶解的包涵体。取样进行 SDS-PAGE 电泳。

(3) 包涵体的过柱纯化。溶解后的包涵体组氨酸标签蛋白上柱, 后续纯化步骤同“可溶性组氨酸标签蛋白的大量纯化”, 只是所用结合缓冲液和洗脱缓冲液中均含有变性剂盐酸胍或尿素。

(4) CL-6B 琼脂糖介质层析柱的恢复。完成洗脱后, 依次使用 10 倍柱体积的去离子水洗涤柱子, 再用 3 倍柱体积的 20% 乙醇平衡 (乙醇要将填料浸没), 最后盖上盖子, 层析柱置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

6. 重组蛋白标签切除 (注 23)

大肠杆菌中诱导出的 GST-目标蛋白过谷胱甘肽琼脂糖 4B 介质层析柱后 (对于组氨酸-目标蛋白, 则过 CL-6B 琼脂糖介质层析柱), 带有 GST 或组氨酸标签的目标蛋白会停留在柱床上, 此时往柱床中加入适量凝血酶, 23 $^{\circ}\text{C}$ 酶切一定时间后 (通常为过夜酶切), 将含有凝血酶和目标蛋白的洗脱液过另外一个纯化柱——HiTrap Benzamidine FF (high sub), 凝血酶被吸附停留在 Benzamidine Sepharose 柱上, 收集洗脱液即为去标签目标蛋白。去标签目标蛋白可以通过 PALL 超滤离心管获得浓缩的去标签目标蛋白, 测定浓度后, 置于 -80°C 保存。也可以通过真空冷冻干燥仪将蛋白干燥为干粉, 测定浓度后, 置于 -80°C 保存。

【注】

1. 大肠杆菌 *E.coli* Rosetta (DE3) 菌株含有原本在大肠杆菌中稀少的真核细胞密码子, 增加了真核细胞的蛋白表达水平。

2. DOC 溶解缓慢, 必要时可加热至 37 $^{\circ}\text{C}$ 溶解至澄清; 室温下可保存数日, 4 $^{\circ}\text{C}$ 可保存较长时间。

3. 细胞或组织样品中含有许多内源性的蛋白酶、磷酸酶等, 容易导致提取物中的蛋白降解或去修饰, 从而影响后续的蛋白检测。因此在提取液中添加适当的蛋白酶、磷酸酶等抑制剂以防止蛋白降解和去修饰。商用的蛋白酶抑制剂混合物 (100 $\times$) 含 200mm AEBSF, 30 μm Aprotinin, 13mm Bestatin, 1.4mm E64 and 1mm Leupeptin。AEBSF 是一种水溶性的丝氨酸蛋白酶不可逆抑制剂, 可以有效抑制胰蛋白酶、糜蛋白酶、纤溶酶、激肽释放酶和凝血酶等蛋白酶。Aprotinin 是丝氨酸蛋白酶的竞争性可逆抑制剂。Bestatin 是氨基肽酶可逆抑制剂。E64

是半胱氨酸蛋白酶不可逆抑制剂。Leupeptin 是丝氨酸和半胱氨酸蛋白酶可逆抑制剂。EDTA 作为螯合剂是金属蛋白酶的可逆抑制剂。

4. 翻译起点的位置非常重要, 因为蛋白质的体外表达不能出现乱码。

5. 蛋白质的大小影响表达效率, 大肠杆菌系统不耐受分子量过大的蛋白质。

6. 蛋白的亲水性和可溶性影响蛋白的溶解性, 疏水性高的蛋白和溶解性小的蛋白容易形成包涵体。

7. 由于 pET 系列载体和 pGEX 系列载体上面有凝血酶酶切位点, 在获得纯化带标签蛋白后, 可以用凝血酶切除标签; 但是如果蛋白质序列本身含有凝血酶酶切位点, 则不适宜用这两种纯化系统。

8. 在构建原核表达载体时, 一定要注意开放阅读框不可以错码或移码, 错码和移码会造成表达错误的目的蛋白。因此在选择载体和酶切位点时, 一定要保证开放阅读框的正确性, 不会发生错码和移码。

9. 测序非常重要, 测序能保证目的基因开放阅读框正确, 如果测序结果显示错码、移码或者乱码, 必须重复实验过程, 直到获得完全正确的开放阅读框。

10. 超声参数需根据仪器型号自行摸索, 一般选 1~10K 频率处理 15 次, 每次 20s, 间隔 1min (整个超声过程必需放置在冰上)。裂解物不能黏稠, 否则会堵塞层析柱。

11. 介质用量需要根据 GST 蛋白产量决定, 通常 100mL 菌液一般使用 200 μ L 介质即可。

12. 含可溶性 GST 标签的上清液置于层析柱, 4 $^{\circ}$ C 放置过夜, 可以提高目的蛋白的吸附率。

13. 为了提高吸附效率, 可以将流出的穿透液重复上柱 2~3 次。

14. 洗脱液体积根据层析柱体积做相应调整。

15. 包涵体是外源基因在原核细胞中表达时, 尤其在大肠杆菌中高效表达时, 形成的由膜包裹的高密度、不溶性蛋白质颗粒, 在显微镜下观察时为高折射区, 与胞质中其他成分有明显区别。由于重组蛋白是大肠杆菌的异源蛋白, 而大肠杆菌缺乏真核生物中翻译后修饰所需酶类, 致使中间体大量积累, 容易形成包涵体沉淀。此外, 包涵体的形成与宿主菌的培养条件, 如培养基成分、温度、pH 值、离子强度等因素有关。包涵体内的蛋白是非折叠状态的聚集体, 不具有生物学活性。因此需要将包涵体从细菌中分离出来, 对包涵体进行溶解, 获得变性的 GST 标签蛋白, 再经过蛋白复性获得有活性的 GST 标签蛋白。

16. 以下所述溶液使用体积, 对应 100mL 细菌培养物。实际操作时, 根据细菌培养物体积进行换算。

17. 透析袋的截留分子量由 GST- 目标蛋白的大小决定。

18. 从透析开始, 以后的操作均需要戴手套, 或者用镊子等。

19. 文中“柱体积”指所用填充介质的体积。

20. 介质用量需要根据组氨酸蛋白产量决定, 最大吸附量为 20~30mg 组氨酸标记蛋白 / mL 介质。实际操作时, 需要根据实验决定介质的取量。

21. 组氨酸标签蛋白的洗脱需要先摸索洗脱的最优咪唑浓度。大量纯化前, 先用少量细菌培养物摸索组氨酸标签蛋白洗脱的最佳浓度。再根据最优洗脱浓度进行大量纯化。

22. 建议优先使用尿素做变性剂, 因为得到的洗脱液可以直接用于 SDS-PAGE 电泳, 而用盐酸胍的洗脱液需先除盐后才能电泳。

23. 本实验介绍的标签切除法为凝血酶切割法。由于 pGEX 和 pET 系列载体在标签后面带有一个凝血酶酶切位点, 可以将标签切除。但是如果目标蛋白内部有凝血酶酶切位点, 则