



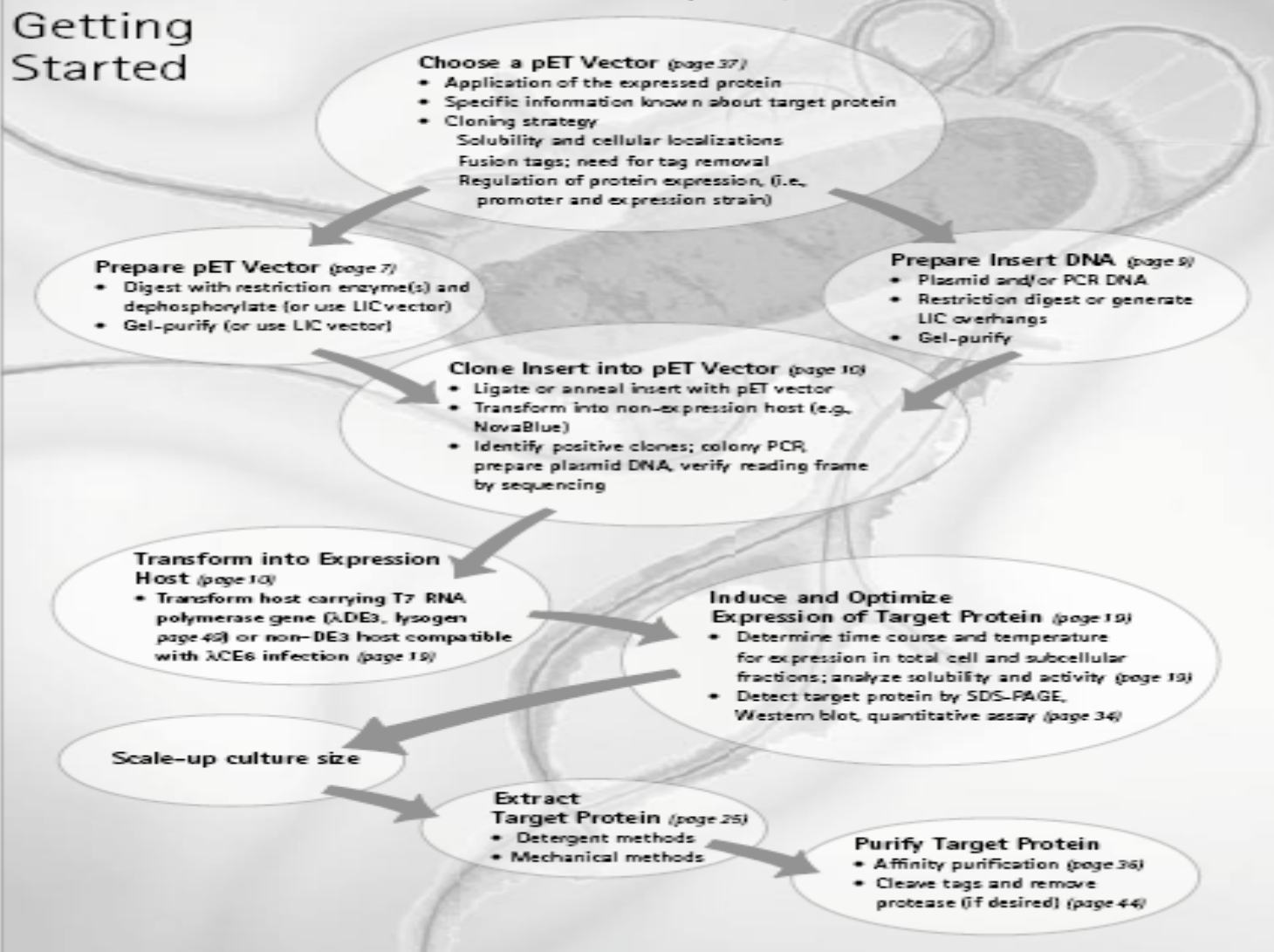
目的基因的表达

expression of target gene

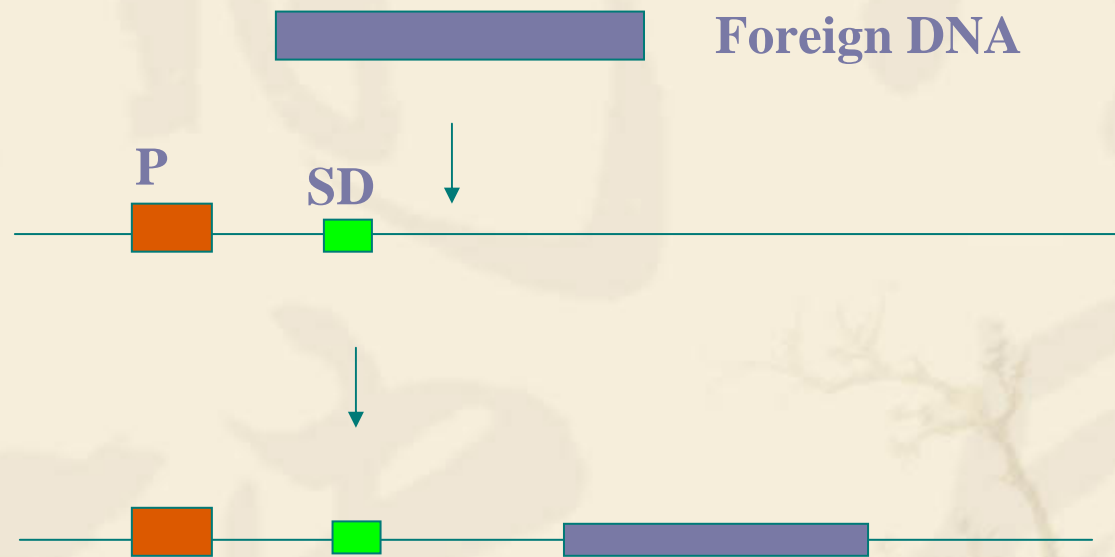


II. Getting Started

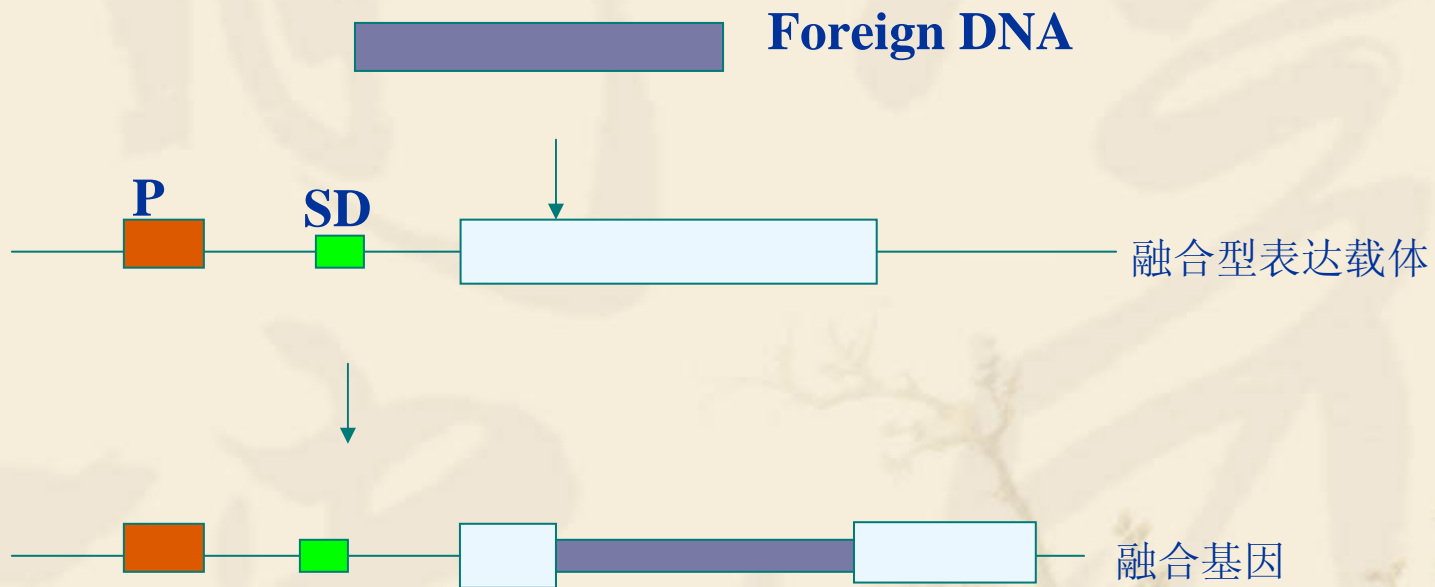
A. Overview of the pET System Process



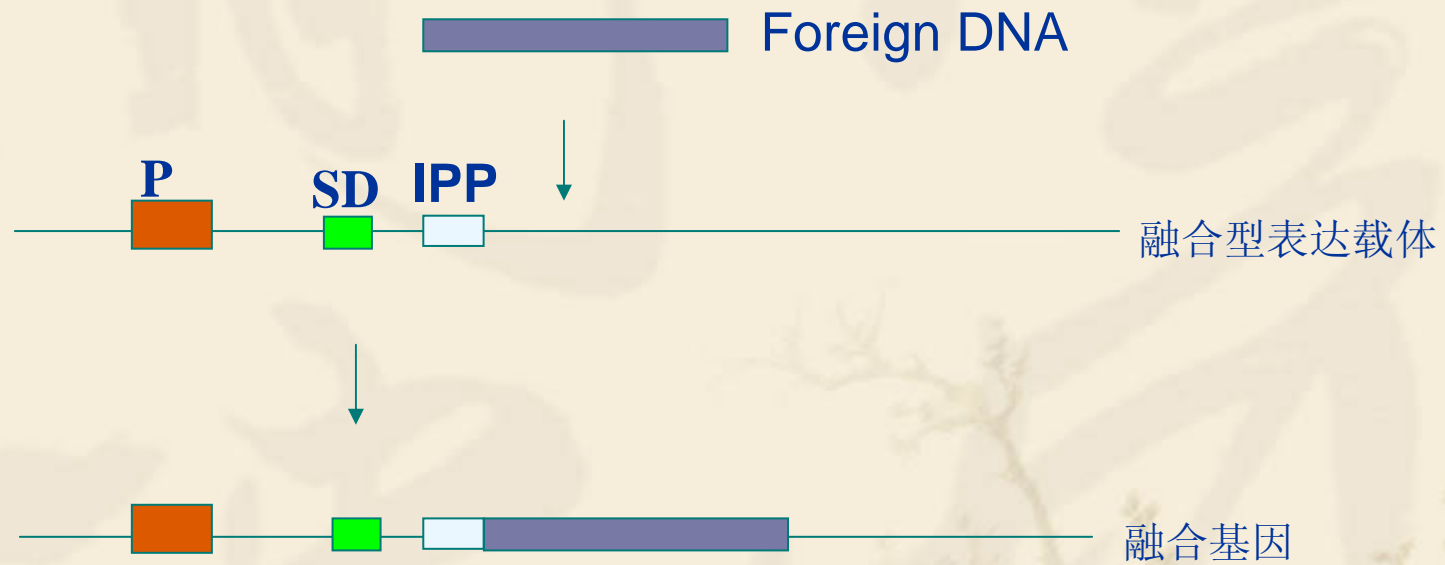
❖ 非融合型表达载体



❖ 融合型表达载体

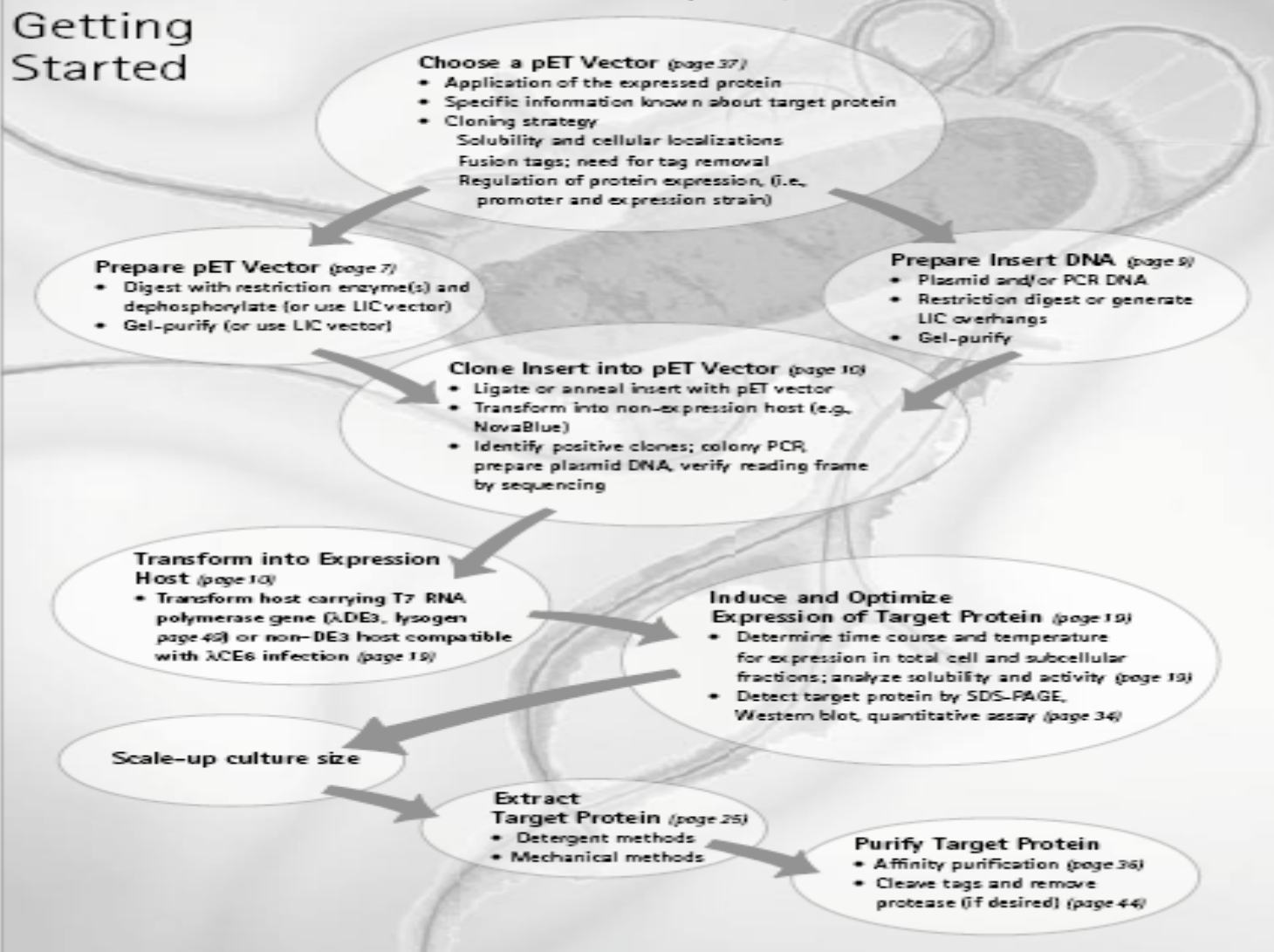


❖ 分泌型表达载体



II. Getting Started

A. Overview of the pET System Process



❖ 原核生物中参与转录和翻译的重要元件

1.启动子

2.终止子

3.SD序列（shine-dalgarno）

4.还有一些其它的调控元件如增强子，衰减子等。

❖ 外源基因在原核表达系统中表达的必要条件

1.删除内含子和5'非编码区；

2.外源基因置于启动子和SD序列控制下；

3.维持正确的开放阅读框（ORF）

4.mRNA稳定且可以有效转译，形成的蛋白质不易被降解

影响基因在原核细胞中表达效率的因素：

1.启动子：建立表达载体的时候，选择强启动子。

常见的原核强启动子：

(1) P_{lac} ：受Lac阻遏蛋白负调，受IPTG的诱导；

(2) P_{trp} ：取自大肠杆菌色氨酸操纵子；

(3) P_{tac} ：Lac启动子和trp启动子的杂合启动子；

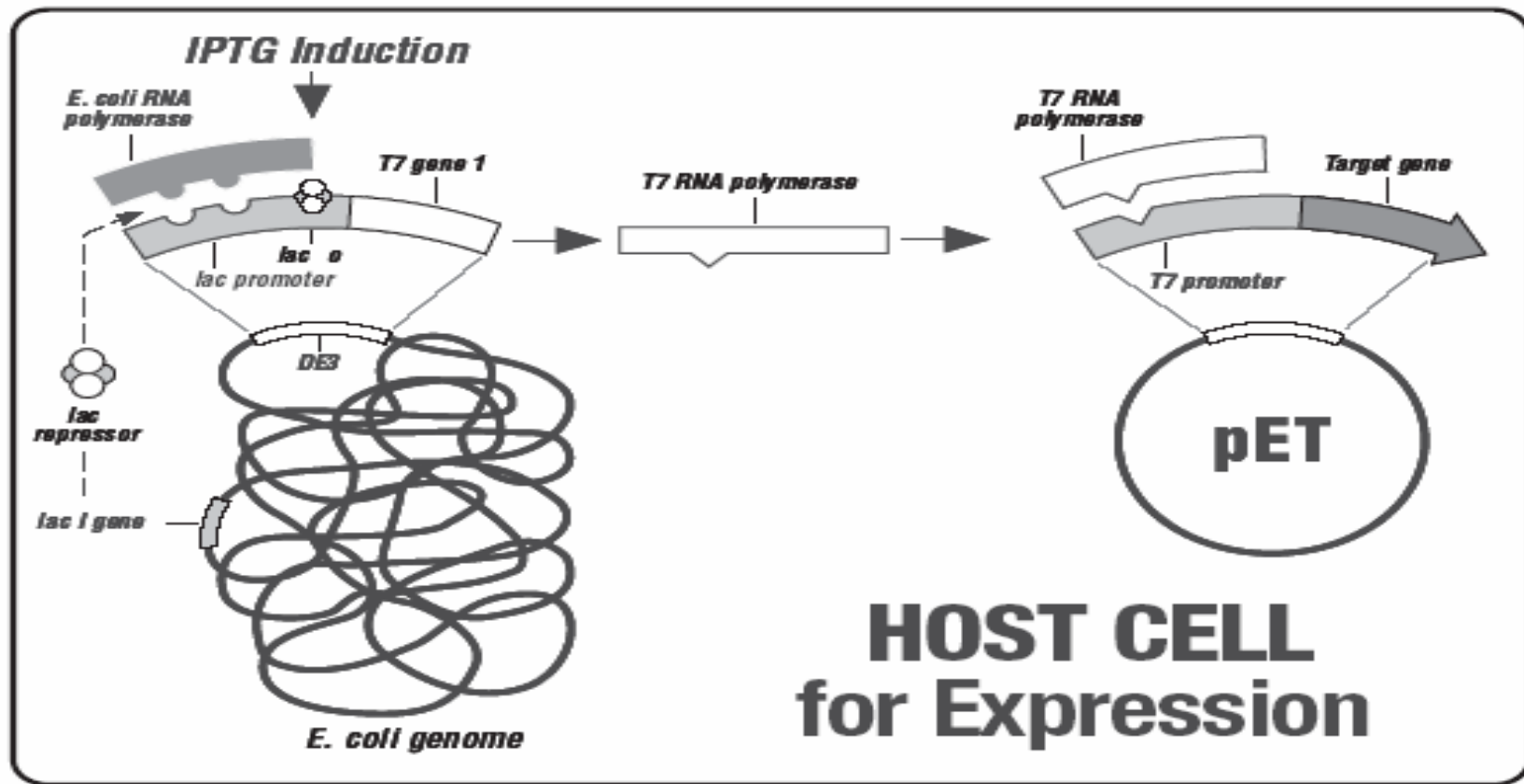
(4) P_L 和 P_R ：噬菌体早期左/右启动子

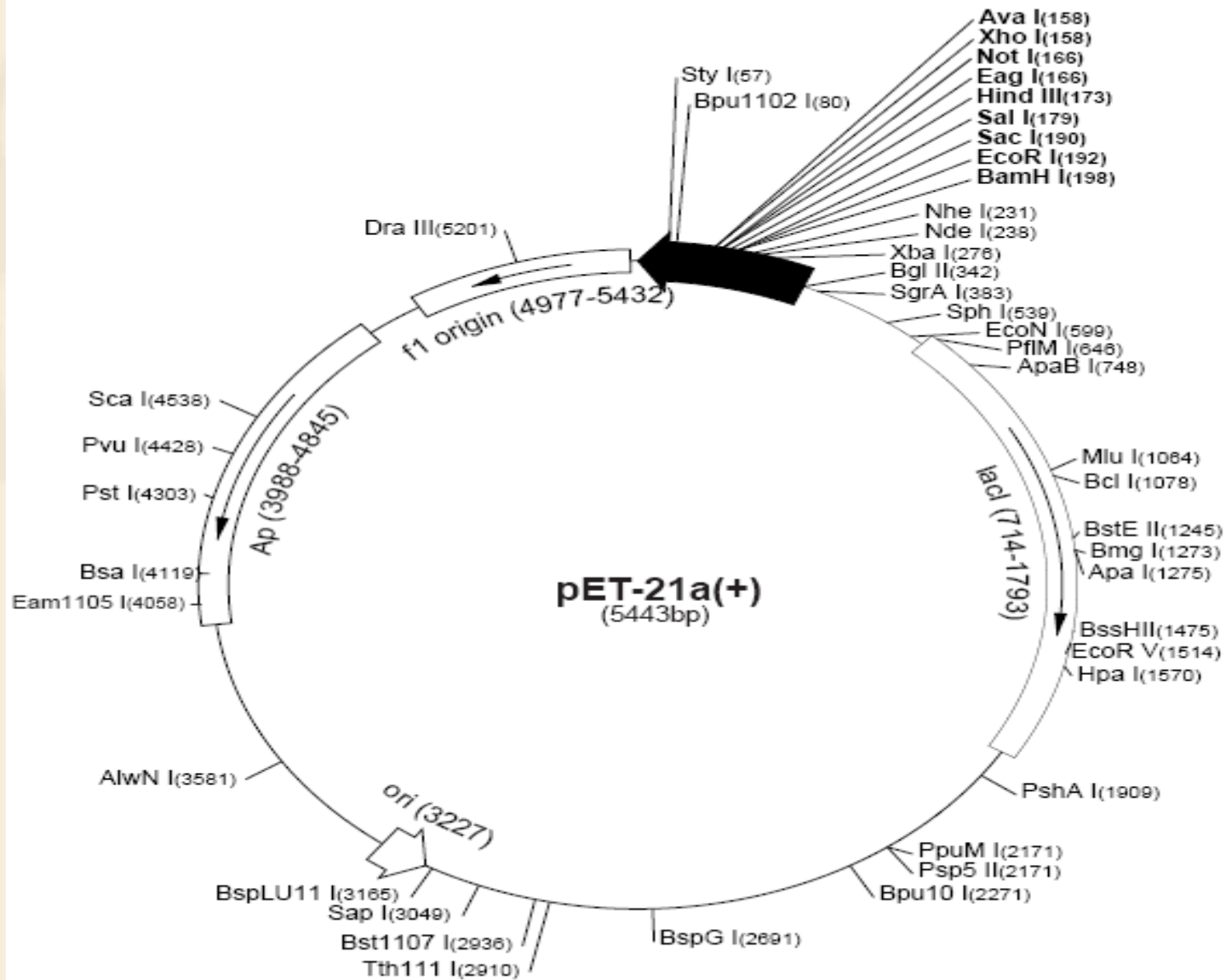
(5) T7启动子。

影响基因在原核细胞中表达效率的因素

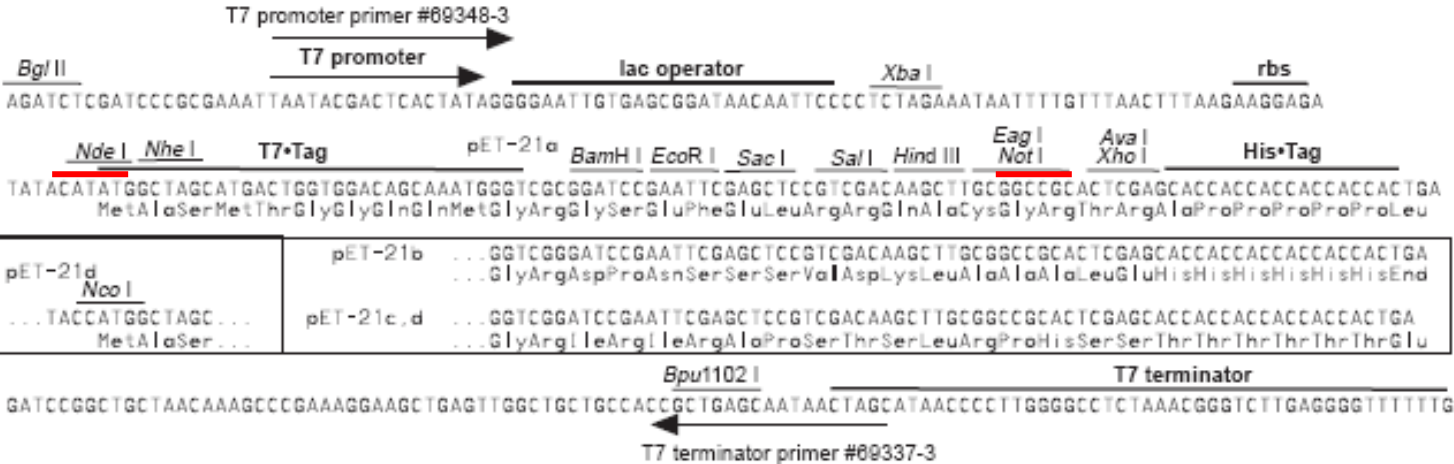
2. 基因剂量 :带目的基因载体的拷贝数。
3. 核糖体结合位点
 - (1) SD顺序与16srRNA3'末端互补程度;
 - (2) AUG—SD间的距离
4. 密码子的选用
5. mRNA和表达产物的稳定性
6. 细胞代谢负荷
7. 工程菌培养条件

PET载体在宿主菌BL21中的调控表达



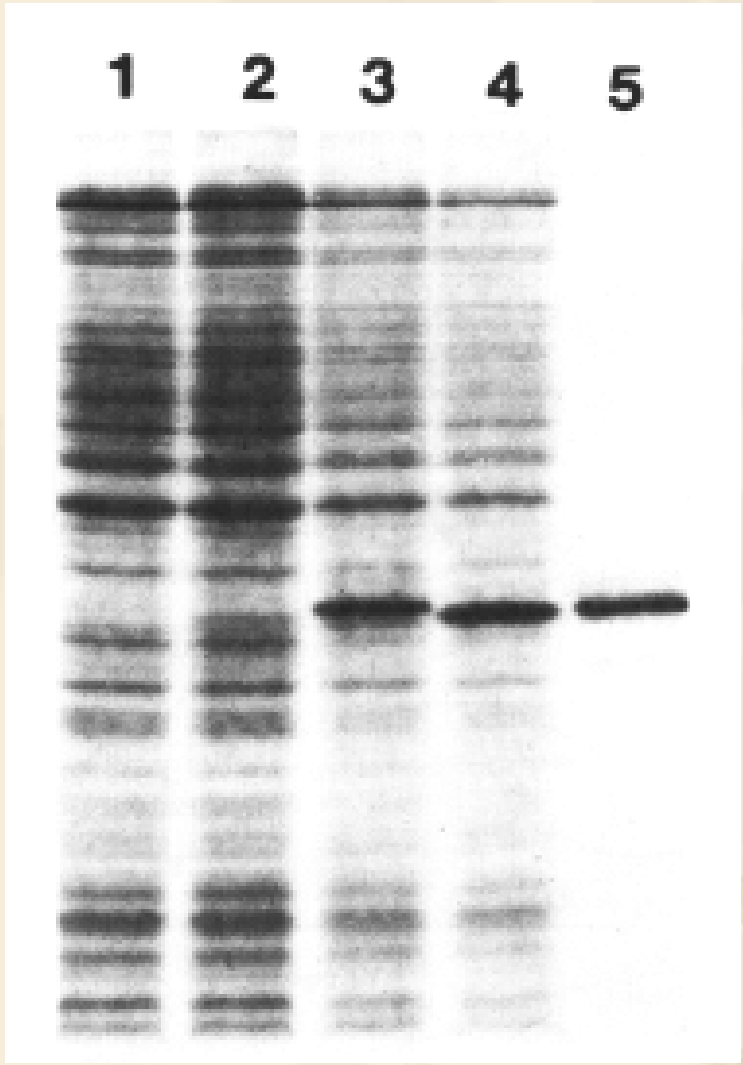
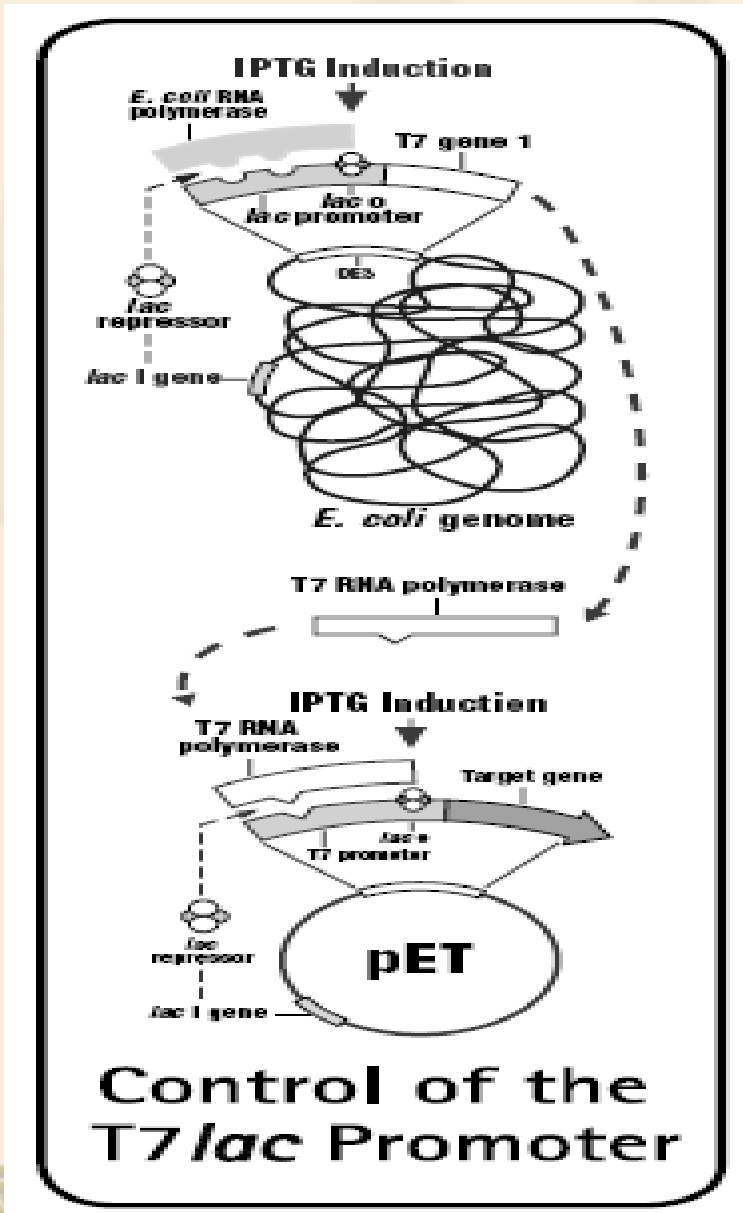


载体 PET-21a

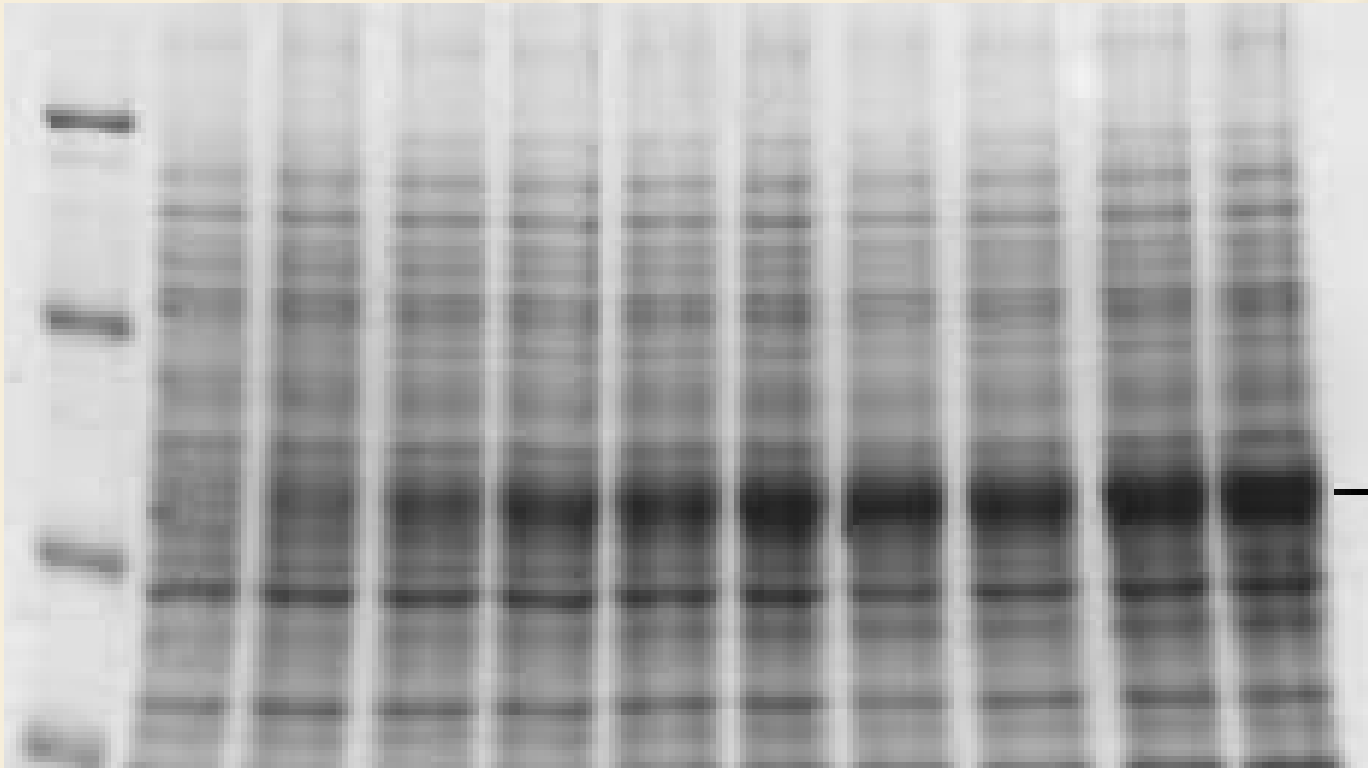


pET-21a-d(+) cloning/expression region

IPTG诱导



IPTG 诱导



IPTG的浓度对表达水平影响非常大

实验中，应在0.01—5.0mmol/L范围寻找最佳使用浓度。

IPTG的加入时机和诱导时间

❖ 外源基因在大肠杆菌中的表达形式

外源基因在大肠杆菌中的表达产物可能存在于细胞质中和（或）细胞外培养基中，其表达形式包括形成不溶性蛋白和可溶性蛋白。

外源基因在大肠杆菌中的表达形式

许多情况下，细胞内目的蛋白聚集成不溶的没有生物活性的结构，称为包涵体。

减少包涵体可对两个参数进行操作：温度和生长速率。降低生长温度可以增加正确折叠得可溶性蛋白得产量，**16°C**或**30°C**可能产生可溶的和有活性的蛋白；使用降低细菌生长速率的培养基组分和**pH**也同样减少其形成。

表达产物的检测

1. 特异性鉴定:

- (1) 荧光抗体法
- (2) 免疫沉淀法
- (3) western印迹法
- (4) 酶联免疫吸附法 (ELISA)
- (5) 固相放射性免疫测定法 (RIA)

2 生物学活性测定

基因表达产物的生物学活性测定在某些情况下不需要对表达产物进行纯化，但为了商业化或者是要得到较纯的外源基因表达产物，则需要对表达产物进行纯化，可以大大提高酶的比活力。

如需要进一步纯化表达蛋白就要通过一些生化的方法如浓缩法，柱层析法分别进行初步分离和进一步的分离纯化。

GSTZ基因的表达及酶活测定

❖ 一、GSTZ基因的诱导表达

- ∞ 含有pET21a-GSTZ重组质粒的BL21(DE3)在LB培养基（Amp浓度为80ug/ml）中37℃振荡培养至OD600≈0.5~0.8;
- ∞ 加入IPTG至1mM，18℃振荡培养过夜。

❖ 二、GSTZ酶粗提液的制备

- ❧ 离心收集菌体：在Eppendorf管中加入1.5ml菌液，10000rpm 2min后弃上清，再加入1.5ml菌液重复一次；
- ❧ 沉淀用600ul裂解液（含有溶菌酶、Triton X-100的0.1M PBS, pH7.4）重悬，室温放置30min；
- ❧ 用低温冰箱反复冻融2次；
- ❧ 冰浴，超声波处理：功率60，超声数次（5sec/次，间隔数秒钟）直至液体基本清亮；
- ❧ 4℃ 15000rpm 15min，上清转移至新管中，此即为酶粗提液。

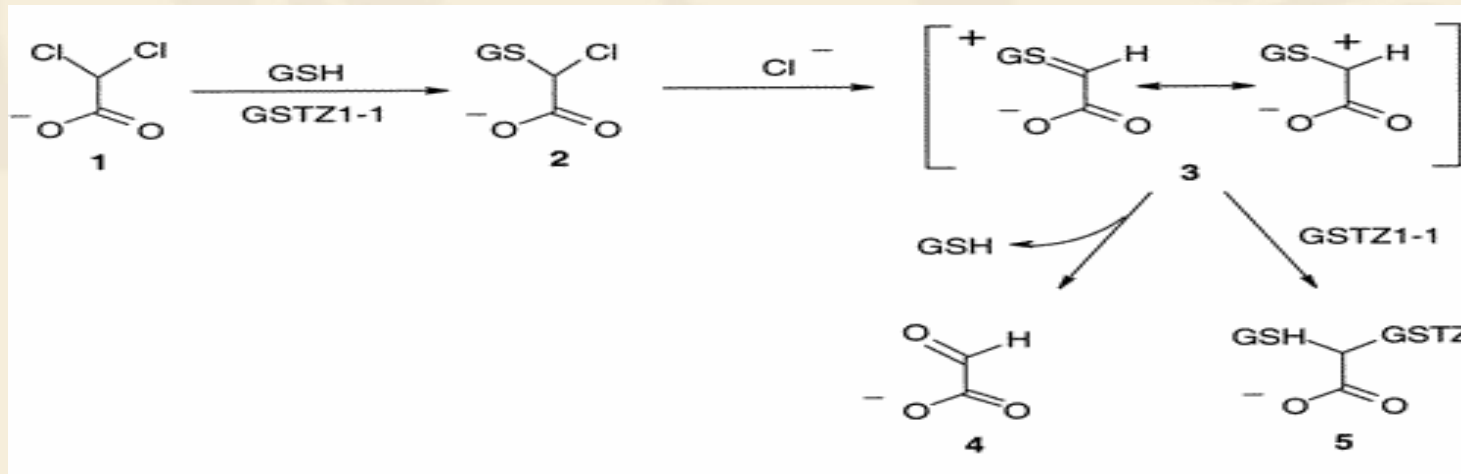
溶菌酶：破细胞壁

Triton X-100：破细胞膜

冻融 和 超声波处理

❖ 三、GSTs的生物学活性测定

🌀 试验原理



CHO-COOH + PHC 铁氰化钾发色的苯胂物

GSTZ基因的表达及酶活测定

❖ 试验步骤

- ❧ 在Eppendorf离心管中加入170ul酶粗提液+20ulGSH+10ulDCA，混匀后37℃反应40min；
- ❧ 加入10ul 三氟乙酸，冰浴10min终止反应；
- ❧ 4℃ 15000rpm 5min，取180ul上清转移至新离心管中；
- ❧ 加入100ul NaOH中和；
- ❧ 加入60ul 0.8M PBS（pH6.8）和85ul 盐酸苯肼，混匀后室温反应10min；
- ❧ 冰浴10min；
- ❧ 加入210ul 预冷浓盐酸和85ul 铁氰化钾，混匀；观察颜色变化。

实验注意事项

- 1 三氟醋酸强挥发性，且有毒
- 2 铁氰化钾剧毒
- 3 本实验主要定性检测，只观察到显色反应即可
- 4 对照
- 5 浓HCl
- 6 缓冲液的种类