

pET System Manual

第 10 版 pET 系统操作手册于 2002 年 7 月修订完成。Novagen 一直致力于研制开发 pET 系统，并将 pET 系统的新进展编入本手册。欲获取 pET 系统的任何最新资讯，请随时登录 Novagen 网站 www.novagen.com。

内容提要

内容提要	1
I. 系统介绍	4
A. 概况	4
B. 使用许可及协议	4
C. 系统组成	4
D. 选择合适的 pET 载体	4
基本考虑因素	5
蛋白溶解性及细胞定位	5
融合标签	5
各种 pET 载体特性列表	7
E. pET 载体克隆策略	8
制备不带融合标签的天然蛋白	8
制备以蛋白酶切去融合标签的天然蛋白	9
不需连接反应的克隆方法 (LIC)	9
F. pET 系统蛋白表达的调控	10
T7lac 启动子	10
pLysS 和 pLysE 宿主菌	10
载体与宿主菌共同影响表达水平	10
含葡萄糖的培养基	11
pLacI 宿主菌	11
pETcoco™ 系统	11
G. 用于克隆的宿主菌	11
H. 用于表达的宿主菌	12
蛋白酶缺陷型	12
调节培养体系中所有细胞的表达水平	12
二硫键的形成及增加蛋白可溶性	12
补充稀有密码子	13
硒代甲硫氨酸标记	13
pET 系统各种宿主菌特性列表	14
I. 抗生素抗性	16
J. CE6 噬菌体	16
K. 诱导对照	17
II. 建立原核表达体系的基本知识	18
A. pET 系统操作流程	18
B. 生长培养基	19
C. 菌株保存	20
D. 制备载体	21
E. 制备插入片段	22
III. 目的片段克隆	23
A. 连接反应	23
B. 转化	23
操作小诀窍	23
操作步骤	24
铺板技术	25



C. pET 重组子分析	25
用 EcoPro™ 系统分析转录/翻译水平	26
质粒模板	26
PCR 模板	26
转录/翻译分析的连接 PCR	28
转录/翻译分析的菌落 PCR	29
菌落筛选	29
质粒制备	30
测序	30
IV. 表达目的基因	30
A. 转化表达用宿主菌株	31
B. DE3 溶原菌的诱导	31
诱导的准备工作	31
诱导的操作步骤	31
V. 优化表达条件	32
A. 增加蛋白溶解性及折叠	32
温度	31
裂解缓冲液	32
细胞周质定位	32
细胞质定位	33
宿主菌	33
B. 稀有密码子	34
C. 毒性基因及质粒不稳定性	33
氨苄青霉素的使用	35
补充葡萄糖	35
质粒稳定性测试	34
稳定甘油菌株保存过程中氨苄抗性 pET 载体上的毒性基因的措施	35
稳定诱导过程中氨苄抗性 pET 载体上的毒性基因的措施	35
D. 影响表达的其它因素	36
N-端原则	36
二级翻译起始位点	36
mRNA 转录产物中的二级结构	37
意外终止密码子	37
转录终止子	37
不稳定的目的 mRNA 及蛋白	37
VI. 目的蛋白分析	38
SDS-PAGE 电泳上样体积标准化	38
生长和诱导	38
诱导培养物的光密度分析	38
A. 用 PopCulture™ 快速分析蛋白表达水平、活性及可溶性	39
B. 细胞总蛋白组分	39
C. 培养基组分	39
D. 细胞周质组分	40
E. 细胞质可溶部分组分	41
BugBuster® 和 Benzonase® 核酸酶处理	41
rLysozyme™ 溶液和冻融处理	42
机械破碎	43
F. 细胞质不溶部分组分	43
BugBuster® 试剂处理后的包涵体纯化	43
机械性裂解细胞的包涵体纯化	43
G. 用 PopCulture™ 试剂制备抽提物	44

pET System Manual



VII. 目的蛋白的鉴定和定量	45
A. 标准 SDS-PAGE 凝胶电泳上样	495
B. 融合标签的检测/分析工具	46
VIII. 目的蛋白的纯化	47
A. 纯化工具	48
B. 溶解与重折叠	50
IX. 诱导对照：	
- 半乳糖苷酶重组物	50
? - 半乳糖苷酶分析	50
X. pET 系统宿主菌以及噬菌体	51
用于蛋白表达的λDE3 溶原菌	51
用于初始克隆、对照和表达的同基因宿主菌	53
pET 系统宿主菌感受态细胞套装产品	54
pET 系统的 ? 噬菌体	54
XI. 附录：基因蛋白功能研究产品	
基因突变产品大全	
蛋白质相互作用双杂交系统	
T7 噬菌体展示系统	
基因沉默研究产品	

- 关于 pET 系统的所有产品的专利、商标信息请参考 Novagen 原版目录。
- Novagen 是德国 Merck KGaA 集团子公司 EMD 公司的品牌之一。
- 所有 Novagen 出售的产品仅供科研之用。

默克中国

免费技术咨询热线 800-820-8872

上海代表处 021-62483388

北京代表处 010-85802406

广州代表处 020-83634531

Novagen 网站 www.novagen.com bioteam@merck-

china.com

操作手册 TB055 第 10 版

Novagen

3



I. 系统介绍

A. 概况

pET 系统是有史以来在 *E.coli* 中克隆表达重组蛋白的功能最强大的系统。目的基因被克隆到 pET 质粒载体上，受噬菌体 T7 强转录及翻译(可选择)信号控制；表达由宿主细胞提供的 T7 RNA 聚合酶诱导。T7 RNA 聚合酶机制十分有效并具选择性：充分诱导时，几乎所有的细胞资源都用于表达目的蛋白；诱导表达后仅几个小时，目的蛋白通常可以占到细胞总蛋白的 50% 以上。尽管该系统极为强大，却仍能很容易地通过降低诱导物的浓度来削弱蛋白表达。降低表达水平可能可以提高某些目的蛋白的可溶部分产量。该系统的另一个重要优点是在非诱导条件下，可以使目的基因完全处于沉默状态而不转录。用不含 T7 RNA 聚合酶的宿主菌克隆目的基因，即可避免因目的蛋白对宿主细胞的可能毒性造成的质粒不稳定(详见 I.F. 部分)。如果用非表达型宿主细胞克隆，可以通过两种方法启动目的蛋白的表达：用带有受 p_L 和 p_T 启动子控制的 T7 RNA 聚合酶的 *CE6* 噬菌体感染宿主细胞，或者将质粒转入带有受 *lacUV5* 控制的 T7 RNA 聚合酶基因的表达型细胞。在第二种情形下，可以通过在细菌培养基中加入 IPTG 来启动表达。尽管有时(例如非毒性目的蛋白)可以直接将目的基因克隆到表达型宿主细胞中，但这种策略并不是通用做法。两种 T7 启动子以及多种拥有不同抑制本底表达水平的宿主细胞共同构成了一个极为灵活而有效的系统，使各种目的蛋白得以最优化表达。

所有 pET 载体以及相关产品均以试剂盒形式提供，用户可以很方便地进行克隆、表达检测以及纯化目的蛋白的所有操作。pET 表达系统包括质粒和宿主菌。您可参考系统组成部分，选择符合具体需要的载体/宿主菌最佳组合。

立即开始表达研究，请直接
从第 18 页开始

B. 使用许可及协议

Novagen 的 T7 表达系统，包括细菌、噬菌体和带有 T7 RNA 聚合酶基因的质粒，均依照非商业用户应用声明相应条款有条件提供。详情请垂询。

C. 系统组成

pET 表达系统提供目的基因克隆和表达所需的核心试剂。

- ? 选定的 pET 载体 DNA，10 μ g
- ? 宿主菌 BL21，BL21(DE3) 以及 BL21(DE3)pLysS 甘油菌^{1,2}
- ? 诱导对照克隆，甘油储存物

区别感受态细胞和甘油菌有一个简单方法，即：甘油菌的包装为旋盖管，而感受态细胞以卡口管形式提供。

系统加感受态细胞包括所有上述组分以及一套 3 种直接用于高效转化 pET 重组子的感受态宿主细胞。每种宿主菌感受态细胞足够用于 10 次转化：

- ? 0.2 ml 分装 NovaBlue，BL21(DE3) 以及 BL21(DE3)pLysS 感受态细胞
- ? SOC 培养基
- ? 对照质粒

¹ pET 多肽表达系统 31 包括 BLR 和 BLR(DE3)pLysS 宿主菌而非 BL21 系列宿主菌。

² pET Trx 融合系统 32 包括 AD494 系列以及 BL21 系列宿主菌。

单独提供的组分和相关产品：参见 Novagen 目录或 Novagen 网站(www.novagen.com) pET 载体系统和感受态细胞完全列表。

D. 选择合适的 pET 载体

pET 载体最初由 Studier 及其同事构建(Studier and Moffatt, 1986; Rosenberg et al., 1987; Studier et al., 1990)。Novagen 开发的系列新 pET 载体则使目的蛋白的克隆、检测以及纯化更加容易。载体大致可分为两大类：转录载体和翻译载体。

- 转录载体用以表达本身带有原核核糖体结合位点和 AUG 起始密码子的目的基因。只有 3 种转录载体：pET-21(+), pET-24(+) 和 pET-23(+)。
- 翻译载体包括来自 T7 噬菌体主要衣壳蛋白的高效核糖体结合位点，用于表达那些不带有核糖体结合位点的目的基因。翻译载体的详细信息请参考 pET 载体特点一览表(第 7 页)。

翻译载体在命名上与转录载体不同，多一个字母后缀，例如 pET-21a(+), 表示相对于 BamHI 克隆位点识别序列 GGATCC 的阅读框。所有带后缀 a 的载体从 GGA 三联密码子开始表达，带 b 的从 GAT 开始，带 c 的从 BamHI 识别序列 ATC 三联密码子开始。带 d 后缀的载体阅读框和带 c 的一样，不同的是它们有一个上游 NcoI 克隆位点而非 NdeI 位点以便直接将目的基因克隆到 AUG 起始密码子。



基本考虑因素

选择合适的 pET 载体通常要综合考虑很多因素。其中包括下列一些基本因素：

- 目的蛋白的应用
- 目的蛋白已知特定信息
- 克隆策略

pET 载体的应用多种多样。例如分析级表达量的蛋白用于活性分析，筛选及确定突变，筛选配体相互作用，制备抗原等。大量活性蛋白用于结构研究，作为试剂或制备亲和基质。可能有多种载体都能满足表达用于筛选或抗原制备所需的分析级表达量的要求，但是，能用于大量纯化的载体-宿主菌-培养条件的最佳组合条件往往是唯一的。如果要连续生产大量高活性的目的蛋白，那么多花些功夫摸索载体-宿主菌-培养条件的组合以便找到最佳条件，是非常值得的。

任何有关目的蛋白的信息都有助于选择合适的载体。例如，有些蛋白表现活性要求一端或两端均无外源序列。大多数 pET 载体可以克隆非融合序列；但是，如果特定翻译起始序列在 *E. coli* 中不能被有效使用，表达水平也会受到一定的影响。在这种情况下，通常是构建一种带有高效表达的氨基末端序列的融合蛋白(参见 pET 载体特点总表，第7页，N 端融合表达)，并在纯化完成后用特定的蛋白酶切去融合序列。不需连接反应的克隆(LIC)在这种情况下特别有用，可以通过肠激酶或 Xa 因子切去所有载体编码的氨基末端序列(参见 pET 载体特点总表，第7页)。

不同的克隆策略、对限制性酶切位点及阅读框的不同要求，会影响对载体的选择。许多 pET 载体具有同样的限制性酶切位点，用户可以仅准备一次目的插入片段，将其插入到多个载体中。不同的要求可以考虑采用不同的 PCR 克隆策略。LIC 载体试剂盒是一种非常有用的产品，可以用来以 PCR 制备插入片段却避免了限制性酶切消化载体和插入序列的操作。

蛋白溶解性及细胞定位

一旦确定了用途和克隆策略，下一步就是判断目的蛋白在细胞中的定位和可溶性。许多后续应用要求目的蛋白以具有生物活性的可溶状态表达。而目的蛋白的可溶性常常受很多因素影响，包括特定的蛋白序列等。在大多数情况下，可溶性并非有或无的现象，载体、宿主菌及培养基的不同选择可以增加或降低可溶/不溶蛋白的量。

正确选用合适的载体和宿主菌组合会明显提高目的蛋白可溶部分比例及活性。载体可以通过三种方式改善目的蛋白的溶解性或正确折叠：1)与本身溶解性高的多肽序列融合表达(例如谷胱甘肽-S-转移酶(GST)，硫氧还蛋白(Trx)及 NusA (N utilization substance A))；2)与催化二硫键形成的酶融合表达(例如 Trx, DsbA, 及 DsbC)；或者 3)与信号序列融合表达，输出到细胞周质。如采用蛋白定位于细胞质的表达载体，可选用允许二硫键在胞质中形成的宿主菌株来使目的蛋白正确折叠(例如带有 *trxB* 和 *gor* 突变的菌株，参见第 12页)。

要获得可溶的活性蛋白，还可以考虑选用能将蛋白转运到细胞周质的载体，因为细胞周质的环境更有利于蛋白折叠和二硫键的形成。因此应选用那些带有信号肽的载体。DsbA 和 DsbC 是 pET-39b(+)及 pET-40b(+)携带的催化二硫键形成/异构化的细胞周质酶。pET 系统中还提供许多不带 DsbA 或 DsbC 编码区而具有信号序列的载体供选择(参见第7页表)。

许多情况下，目的蛋白聚集成不溶的没有生物活性的结构，称为包涵体。形成包涵体较有利于纯化：1)容易通过离心收获浓度高而相对纯净的蛋白；2)包涵体保护蛋白免受蛋白酶水解。另外，毒性蛋白以无活性的包涵体形式表达，不会影响宿主菌的生长。

纯化方法中有一些专用于纯化细胞质中的包涵体。收集包涵体后将其溶解，可以使目的蛋白在体外重折叠。采用这种方法能够获得很高的蛋白产量并避免宿主菌中的蛋白酶降解。然而，不同蛋白重折叠为活性蛋白的效率大不相同，有时则非常低。因此，此法仅建议用于制备抗原或用于不特别要求正确折叠的应用情况。pET-17xb 以 N 端融合蛋白形式表达全长 220 aa T7 基因 10 蛋白，并形成包涵体。pET-31b(+)也是表达融合蛋白包涵体的代表，非常适合制备小蛋白和多肽。

融合标签

融合标签用于检测和纯化目的蛋白，有时也通过增加目的蛋白在细胞质中的可溶性或帮助将目的蛋白运转到细胞周质中以提高目的蛋白的生物活性。配合特定应用的要求，你可以制备带有以下标签的融合蛋白：S•Tag™, T7•Tag®, GST•Tag™, His•Tag®, HSV•Tag® 或 Nus•Tag™, 很方便用 Western Blot 检测。这其中有些多肽(融合序列)很小，对检测试剂的特异性和灵敏度有特别的要求。His•Tag, GST•Tag, S•Tag 以及 T7•Tag 亦可用相应的树脂及缓冲液试剂盒进行亲和纯化。



使用 S•Tag 及 GST•Tag 检测试剂盒可以对粗提物中的融合蛋白或纯化的蛋白进行精确定量测定。FRETWorks™S•Tag 分析试剂盒基于一种特别的材料能通过荧光检测 1 fmol 以下的融合蛋白。

His•Tag 是常用的纯化蛋白的融合标签，特别是那些以包涵体形式表达的蛋白。 可以将蛋白在完全变性条件下溶解，继而进行亲和纯化。

CBD•Tag™ 序列也常用于低成本亲和纯化。尤其适用于重新折叠操作 [pET-34b(+) 和 35b(+) 带有 CBD_{clos}•Tag 序列]；只有正确折叠的 CBDs 方能与纤维素基质结合，而折叠不正确的组分则可通过 CBinD™ 亲和纯化操作有效去除。尽管许多标签都可用于固定目的蛋白，CBD•Tag 却因纤维素基质本身极低的非特异性结合和生物兼容性而特别值得推荐。

据报道 Nus•Tag™，Trx•Tag™ 及 GST•Tag™ 序列可以增加融合表达蛋白的溶解性。氨苄抗性的 Nus•Tag 和 Trx•Tag 载体与 Origami™，Origami B 及 Rosetta-gami™ 等能在细胞质中形成二硫键的宿主菌配合使用 (参见第 12 页)。

下表列出了各种融合标签及对应的 pET 载体。有些 pET 载体可带有多个 5' 端融合标签 (参见第 7 页)。另外，许多载体能表达两端带有不同的多肽标签的融合蛋白。 选用在 5' 端标签与目的序列间有蛋白酶切位点 (凝血酶，肠激酶，Xa 因子) 的载体可以在纯化完成后切去一个或多个融合标签。表达 C-端融合序列时要特别注意的是：(1) 插入序列不含终止密码子；(2) 克隆保留正确的阅读框。

pET 载体各种融合标签

标签	N/C 端或内部 (I)	大小 (氨基酸)	鉴定/纯化原理	应用	pET 载体
T7•Tag®	N, I	11 或 260	单克隆抗体	AP, IF, IP, WB	3, 5, 9, 11, 17 17x, 21, 23, 24, 28, 33
S•Tag™	N, I	15	S-蛋白(104aa)亲和	AP, QA, WB	29, 30, 32, 34-37, 39-44
His•Tag®	N, C, I	6, 8, 或 10	金属整合层析(天然或变性)，单克隆抗体	AP, IF, WB	14-16, 19-44
HSV•Tag®	C	11	单克隆抗体	IF, WB	25, 27, 43.1, 44
<i>pelB/ompT</i>	N	20/22	细胞周质定位	PE	12, 20, 22, 25, 26, 27
KSI	N	125	疏水区	PP	31
Trx•Tag™	N	109	硫氧还蛋白驱动二硫键形成 特别是在 <i>trxB</i> 和 <i>trxB/gor</i> 宿主菌中	DB, SP	32
PKA site	I	5	蛋白激酶 A 识别位点	PS	33
CBD _{clos} •Tag	N	156	多克隆抗体，纤维素结合区	IP, AP, WB	34, 35
CBD _{cenA} •Tag	N	114	多克隆抗体，纤维素结合区，细胞周质/培养基	IP, AP, PE, WB	36, 37
CBD _{cec} •Tag	C	107	多克隆抗体，纤维素结合区，细胞周质/培养基	IP, AP, PE, WB	38
Dsb•Tag™	N	208 (DsbA) 236 (DsbC)	细胞周质定位	DB, DI, PE, SP	39, 40
GST•Tag™	N	220	单克隆抗体，酶活性，谷胱甘肽亲和	AP, IF, IP, QA, WB	41, 42
Nus•Tag™	N, I	495	提高细胞质可溶性，单克隆抗体	SP, WB	43.1, 44

AP = 亲和纯化

DB = 二硫键

DI = 二硫键异构化

IF = 免疫荧光

IP = 免疫沉淀

PE = 蛋白输出

PP = 小蛋白/多肽制备

PS = 体外磷酸化

QA = 定量分析

SP = 可溶蛋白

WB = Western 印迹

pET System Manual 系统介绍



各种 pET 载体特性列表

下表列出用于各种克隆需要的 pET 载体。其中命名后带有(+)的载体含有 f1 复制区，可以制备单链 DNA，适合突变及测序等应用。

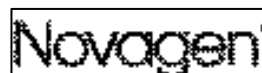
载体	amp ^R	kan ^R	T7	T7lac	T7• Tag ¹¹ His• Tag ⁹	S? Tag ²⁶⁰ T7? Tag ²⁶⁰	Trx? Tag ²⁶⁰	CBD? Tag ²⁶⁰	Tag TM	HSV• Tag [®] KSI	Dsb• Tag TM PKA	Nus? Tag TM GST• Tag TM	信号序列 蛋白酶	
pET-3a-d					N									
pET-9a-d					N									
pET-11a-d					N									
pET-12a-c														
pET-14b					N								T	
pET-15b					N								T	
pET-16b					N								X	
pET-17b					N									
pET-17xb						N								
pET-19b					N								E	
pET-20b(+)					C									
pET-21a-d(+)					C	N								
pET-22b(+)					C									
pET-23a-d(+)					C	N								
pET-24a-d(+)					C	N								
pET-25b(+)					C					C				
pET-26b(+)					C									
pET-27b(+)					C					C				
pET-28a-c(+)					N,C	I							T	
pET-29a-c(+)					C		N						T	
pET-30a-c(+)					N,C		I						T,E	
pET-30 Ek/LIC					N,C		I						T,E	
pET-30 Xa/LIC					N,C		I						T,X	
pET-31b(+)					C				N					
pET-32a-c(+)					I,C		I	N					T,E	
pET-32 Ek/LIC					I,C		I	N					T,E	
pET-32 Xa/LIC					I,C		I	N					T,X	
pET-33b(+)					N,C	I				I			T	
pET-34b(+)					C		I		N				T,E	
pET-35b(+)					C		I		N				T,X	
pET-36b(+)					C		I		N				T,E	
pET-37b(+)					C		I		N				T,X	
pET-38b(+)					C		I		C				T	
pET-39b(+)					I,C		I				N		T,E	
pET-40b(+)					I,C		I				N		T,E	
pET-41a-c(+)					I,C		I					N	T,E	
pET-41 Ek/LIC					I,C		I					N	T,E	
pET-42a-c(+)					I,C		I					N	T,X	
pET-43.1a-c(+)					I,C		I			C			N	T,E
pET-43.1 Ek/LIC					I,C		I			C			N	T,E
pET-44a-c(+)					N,I,C		I			C			I	T,E

载体 kan^R T7lac T7• Tag¹¹ S• Tag CBD? Tag HSV• Tag Dsb• Tag Nus? Tag 信号序列
 amp^R T7 His• Tag T7? Tag²⁶⁰ Trx• Tag GST• Tag KSI
 PKA 蛋白酶

注：T7? Tag¹¹ = 11aa 融合标签 T7? Tag²⁶⁰ = 260aa 融合标签
 signal seq. = 用于细胞质定位信号序列
 I = 内部标签 N = N-端标签 C = 可选的 C-端标签
 蛋白酶酶切位点：T = 凝血酶 E = 胰凝乳蛋白酶 X = Xa 因子

默克中国
 免费技术咨询热线 800-820-8872
 上海代表处 021-62483388
 北京代表处 010-85802406
 广州代表处 020-83634531
 Novagen 网站 www.novagen.com
 china.com

操作手册 TB055 第 10 版





LIC = 不需连接反应的克隆

E. pET 载体克隆策略

将编码蛋白的 DNA 克隆到 pET 载体上有多种策略。利用多克隆位点中的特定限制性酶切位点或非连接反应依赖性克隆方法(LIC)能很方便地完成克隆。LIC 方法不需要进行限制性酶切及连接反应，LIC 插入片段可以被迅速地克隆到多功能 LIC 载体上，适用于高通量克隆。所有 pET 载体图谱可以参阅网站www.novagen.com相关信息。

所有 pET 翻译载体在克隆和标签区域后以 3 种阅读框形式提供翻译终止密码子以及下游 T7 转录终止子。终止子对于大多数蛋白的高效表达并非必要，但对于一些带有方向与目的基因一致的氨苄抗性基因(β-内酰胺酶)的 pET 质粒情况就不同了。如果 T7 转录终止子在克隆时被去掉，就会出现随目的蛋白增加，IPTG 依赖的 β-内酰胺酶(M_r 31.5 kDa)累积的情况，因为这时 T7 RNA 聚合酶造成高效通读转录。

不同 pET 载体在邻近克隆位点处具有编码不同的多肽“标签”的序列，在定位、检测或纯化目的蛋白时提供方便。选用的克隆方式将决定这些“标签”或载体的附加氨基酸是否与目的蛋白一起融合表达。后续章节将介绍几种融合或非融合表达的克隆方法。

制备不带融合标签的天然蛋白

几乎所有 pET 载体都能表达不带载体编码序列的蛋白。许多载体提供一个 *Nde* I 或 *Nco* I 位点，以便在插入编码序列 5'-端克隆进 AUG 起始密码子。与此类似，在插入片段中带上翻译终止密码子，就可以避免在蛋白的 C-端带有载体编码序列。

在许多 pET 载体中，*Nco* I 位点(CCATGG)中的 ATG 三联密码子编码 T7 RNA 聚合酶转录产物 N-端甲硫氨酸 AUG 起始密码子。任何目的基因或 PCR 制备的插入片段，若在开放阅读框的起始位置带有 *Nco* I 位点或与 *Nco* I 匹配的粘末端 [*Bsp*HI (TCATGA)，*Bsp*LU11 I (ACATGT)，以及 *Afl* III (ACRYGT)和 *Sfy* I (CCWWGG)]，均可克隆入 *Nco* I 位点。注意，如果目的基因内部编码多个相同酶切位点，使用这些限制性酶切位点将十分复杂。此外，若每个限制性酶切位点作为下一个三联密码子的第一个核苷酸，可能无法得到天然蛋白。如果是这种情况，可以考虑采用某些限制性酶切去识别位点“下游”序列，以期得到天然目的蛋白(见下表)。

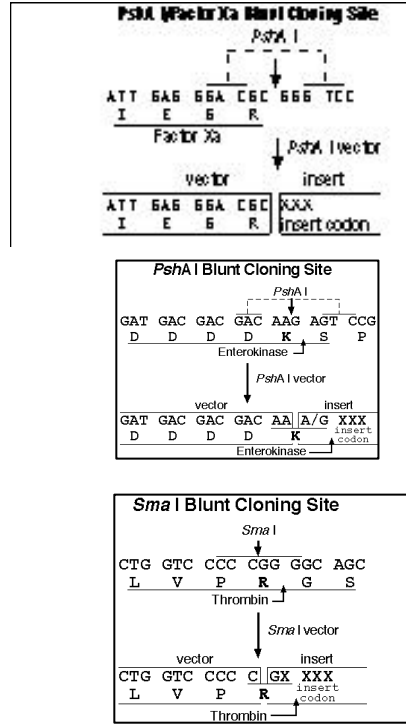
酶 (同裂酶)	识别及切割位点	产生的粘端(参见 pET 载体特点总表, 第 7 页)
<i>Bbs</i> I (<i>Bpi</i> I, <i>Bpu</i> A I)	5'-GAAGAC(N) ₂ -3' 3'-CTTCTG(N) ₆ -5'	GAAGACNN NNNNN CTTCTGNNNNNN N
<i>Bsa</i> I (<i>Eco</i> 31 I)	5'-GGTCTC(N) ₁ -3' 3'-CCAGAG(N) ₆ -5'	GGTCTCN NNNNN CCAGAGNNNNNN N
<i>Bsm</i> B I (<i>Esp</i> 3 I)	5'-CGTCTC(N) ₁ -3' 3'-GCAGAG(N) ₅ -5'	CGTCTCN NNNNN GCAGAGNNNNNN N
<i>Bsp</i> M I	5'-ACCTGC(N) ₄ -3' 3'-TGGACG(N) ₈ -5'	ACCTGCNNNN NNNNN TGGACGNNNNNNNN N

任何上述限制性酶切位点都可以通过 PCR 引物设计得到，从而获得与 *Nco* I 匹配的粘端。要注意的是，和许多采用限制性酶切消化策略一样，如果目的基因编码完全雷同酶切位点时，这种简便方法的使用就会受到一定的限制。但是，不太可能某个插入片段同时包含以上 4 种酶位点。



制备以蛋白酶切去融合标签的天然蛋白

GST•Tag™[pET-41a-c(+), 42a-c(+)]和 Nus•Tag™[pET-43.1a-c(+), pET-44a-c(+)]载体上, 在编码 Xa 因子, 肠激酶或凝血酶酶切位点序列内带有 *Pst*I 或 *Sma*I 限制性酶切位点。利用这些产生平末端的限制性酶(如下图所示), Xa 因子、肠激酶或凝血酶即可从融合蛋白上切去所有载体编码序列。凝血酶的酶切效率会受到紧邻酶切位点的氨基酸影响。选用非极性或非酸性氨基酸作为起始的 2 到 3 个氨基酸有利于提高凝血酶酶切效率(Chang, 1985; Le Bonniec, 1991; Le Bonniec, 1996)。



不需连接反应的克隆方法(LIC)

LIC 是设计用于不需限制性酶切和连接反应而定向克隆 PCR 产物的方法(Aslanidis and de Jong, 1990; Haun et al., 1992)。用 LIC 法制备的 pET 载体有不互补的 12-15 碱基单链粘端, 与目的插入片段上相应粘端互补。扩增目的插入片段的引物 5' 序列要与 LIC 载体互补。T4 DNA 聚合酶的 3' 5' 外切活性经短时间即可在插入片段上形成单链粘端。由于只能由制备好的插入片段和载体互相退火形成产物, 这种方法非常快速高效, 而且为定向克隆。pET LIC 载体上所有载体编码的氨基酸序列都可以通过肠激酶或 Xa 因子去掉。LIC 克隆策略详见操作手册 TB163 和 TB205。



F. pET 系统蛋白表达的调控

即使在没有 IPTG 存在的情况下,也会有少量 *lacUV5* 启动子表达的 T7 RNA 聚合酶,因此存在目的蛋白的本底表达。任何重组蛋白在 *E. coli* 内表达都会或多或少地影响宿主的正常功能,并对宿主产生“毒性”。不同的外源蛋白毒性也不同。如果目的基因产物对 *E. coli* 毒性极大,这种本底表达就足以阻碍细胞生长以及影响在 DE3 溶原菌中质粒的稳定性。pET 系统功能非常强大,你可以根据目的蛋白的特点,通过选用 T7/T7lac 启动子, pLysS 或 pLysE 宿主菌,以及培养基外加葡萄糖等方法严格控制蛋白表达水平。也要注意,不要因为过度控制造成表达水平过低。因此,仔细了解下列工具的功能特点,以及根据实际经验为特定目的蛋白表达选择这些工具,两方面都很重要。

T7lac 启动子

控制基础表达的手段之一是采用带有 T7lac 启动子的载体 (Studier et al., 1990; Dubendorff and Studier, 1991; 见第 7 页表)。这些质粒在紧邻 T7 启动子的下游有一个 *lac* 操纵子序列。它们同样带有常规启动子以及编码 *lac* 阻遏蛋白 (*lacI*) 的序列, T7lac 和 *lacI* 启动子位置交错。采用这种载体及 DE3 溶原菌, *lac* 阻遏蛋白可以作用于宿主染色体 *lacUV5* 启动子,抑制宿主聚合酶转录 T7 RNA 聚合酶,也作用于载体 T7lac 启动子,以阻断任何 T7 RNA 聚合酶导致的目的基因转录。只有极少数毒性极大的目的基因造成质粒在 BL21 (DE3) 或 HMS174 (DE3) 中不稳定 (Dubendorff and Studier, 1991)。注意:结合 pLysS 或 pLysE 宿主菌,蛋白表达有被过度调节的可能 (见载体与宿主菌共同影响表达水平,见本页)。

pLysS 和 pLysE 宿主菌

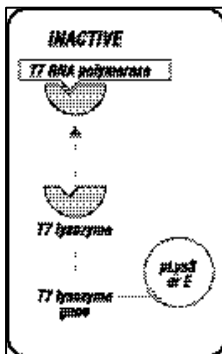
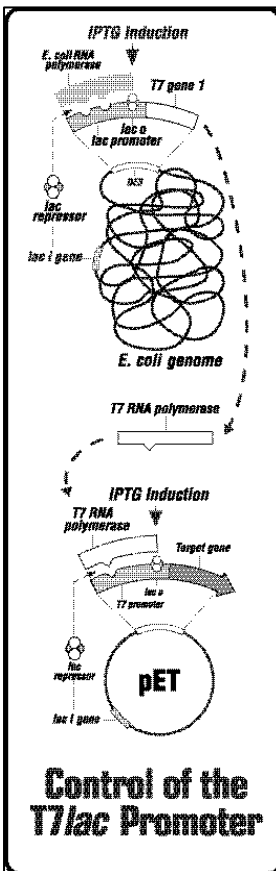
另一个为目的基因提供稳定性保证的方法是在拥有兼容的氯霉素抗性、编码表达少量 T7 溶菌酶 (T7 RNA 聚合酶天然抑制物) 的宿主菌中表达 (Moffatt and Studier, 1987; Studier, 1991)。T7 溶菌酶是一种双功能蛋白:它能够切割大肠杆菌细胞壁肽聚糖层 (Inouye et al., 1973),它也可与 T7 RNA 聚合酶结合,阻止转录 (Zhang and Studier, 1997; Huang et al., 1999)。T7 溶菌酶由克隆到 pACYC184 BamHI 位点的 T7 溶菌酶基因供给细胞 (Chang and Cohen, 1978)。克隆片段 (T7 DNA 的 10,665–11,296bp; Dunn and Studier, 1983) 在紧邻溶菌酶基因处还有 T7 RNA 聚合酶 3.8 promoter 启动子。由 pACYC184 的 *tet* 启动子控制的溶菌酶基因,按这种序列排列的质粒被称为 pLysE,带有这种质粒的菌株会高水平积累溶菌酶。序列反向排列的质粒被称为 pLysS;带有这种质粒的细胞积累溶菌酶的水平要低得多。注意,从 pLysS 宿主菌表达溶菌酶同样受培养条件影响。因为上游的 CAT 抗生素抗性基因由一个代谢产物抑制敏感启动子调节, pLysS 宿主菌在没有葡萄糖生长到平稳期时会产生高水平 cAMP 和更高的 CAT 启动子活性。而当细胞培养到平稳期时,高 CAT 启动子活性会提高溶菌酶水平 (Novy and Morris, 2001)。而如果 T7 溶菌酶是由克隆基因提供的,大肠杆菌的耐受水平相对较高 (例如细胞不会裂解),这显然是因为表达出的蛋白无法穿过细胞内膜到达肽聚糖层。

两种溶菌酶质粒都不会干扰对含有该种质粒细胞的转化; pLysS 对细胞生长影响很小,而 pLysE 会明显降低宿主菌的生长水平。pLysE 提供的高水平的溶菌酶会大幅度增加蛋白表达的滞后时间,降低通过诱导 T7 RNA 聚合酶表达目的基因的最高水平。含有相对无害的目的基因的宿主细胞可以在 IPTG 存在下持续生长, pLysE 对这些细胞蛋白表达的有效阻滞作用在某些情况下是一个有用的特点。pLysS 和 pLysE 溶原菌对带毒性基因的载体的耐受性有所提高:不稳定的质粒变得稳定,无法构建成功的质粒能够获得和表达。pLysE 造成细胞生长缓慢并有裂解倾向,在大多数情况下使用不便。对于毒性极大的基因,带有 T7lac 启动子的质粒和 pLysS 宿主菌是最佳选择。

有 pLysS (或 pLysE) 存在时制备细胞抽提物特别方便。目的蛋白表达后,收集细胞并重悬于 50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8.0 缓冲液。简单冻融,或加入 0.1% Triton X-100,细胞内的 T7 溶菌酶即可有效裂解细胞。PopCulture™ 和 BugBuster™ 蛋白抽提试剂可以帮助带有 pLysS 和 pLysE 质粒的菌株充分释放蛋白。这个特点使带有 pLysS 质粒的细胞在即使不特别要求目的质粒稳定性的情况下,仍然不失为一种不错的选择。注意,在利用重组子带有信号序列分离细胞周质部分蛋白时,建议不使用 pLysS 或 pLysE 质粒 (因为宿主产生的 T7 溶菌酶会使细胞膜崩溃)。

载体与宿主菌共同影响表达水平

实际操作中,通常需要尝试多种不同载体/宿主菌组合以期获得拥有正确结构的目的蛋白的高水平表达。当使用“普通”T7 启动子时, pLysS 提供的低水平溶菌酶对 T7 RNA 聚合酶诱导后的目的蛋白表达影响很小,只是在出现目的基因产物时有短时延滞。显然,产生的 T7 RNA 聚合酶比被少量溶菌酶抑制的要多。(估计诱导时溶菌酶水平有所提高,因为 T7 RNA 聚合酶能够开始使 pLysS 质粒基因完全转录产生溶菌酶 mRNA。但是, 3.8 启动子是相对较弱的启动子 (McAllister et al., 1981),主要转录仍然来自于目的质粒采用的强启动子 10。)当采用 T7lac 启动子时,我们观





察到特定诱导条件下，pLysS宿主菌中的表达水平比非pLysS宿主菌相对较低。具体实例见 Mierendorf 等 1994 年综述，两个目的蛋白在不同 T7/T7lac 启动子和 pLysS 及 pLysE 宿主菌中的表达差异比较。

含葡萄糖的培养基

Grossman 等(1998)首次描述，培养基中添加葡萄糖可以维持 pET 系统中低水平本底表达。当培养细胞到达稳定期时，葡萄糖会作为第一碳源首先被利用，而后才是甘油等碳源。替代碳源的代谢导致 λ DE3 溶原菌中环 AMP (cAMP) 水平提高，从而刺激 *lacUV5* 启动子指导的转录，T7 RNA 聚合酶表达。与野生型 *lac* 启动子相比，*lacUV5* 启动子对 cAMP 刺激不如野生型敏感(Eron and Block, 1971; Fried and Crothers, 1984)。但研究显示，足够的刺激可以提高 T7 RNA 聚合酶水平，继而 T7 启动子调节目的基因表达(Kelley, 1995; Grossman et al., 1998; Pan and Malcom, 2000; Novy and Morris, 2001)。已观察到当细胞进入稳定期时，在标准培养基中补充加入葡萄糖，*lacUV5* 启动子带来的本底表达大幅度下降(Grossman et al., 1998; Pan and Malcom, 2000; Novy and Morris, 2001)。

最低限度的本底表达对于 pET 载体在不带有 pLysS 质粒的宿主菌中表达至关重要，特别是当目的基因有毒性时，要生长达到稳定期(16 h 或过夜培养)就更是如此(Grossman et al., 1998; Novy and Morris, 2001)。没有了来自 pLysS 质粒的 T7 溶菌酶，细胞稳定期本底表达水平就会提高。如果外源基因有毒性，在液体培养基和琼脂平板中加入 0.5–1% 葡萄糖以维持质粒稳定是非常必要的。包含 pLysS 质粒的宿主菌达到稳定期时溶菌酶表达水平较高，而目的蛋白表达水平降低。造成这种情况的原因可能是 CAT 基因启动子在没有葡萄糖时也对 cAMP 刺激敏感，而且位于 pLysS 的 T7 溶菌酶基因的上游(Novy and Morris, 2001)。

注意：在非表达宿主菌中进行克隆步骤时，不必要也不建议外加葡萄糖。虽然细菌生长到稳定期时不建议这样做，葡萄糖可以维持 pET 系统在 λ DE3 宿主菌中最低水平本底表达目的蛋白，阻止 T7 溶菌酶过表达。

pLacI 宿主菌

特别的(DE3)pLacI 表达菌株只用于高拷贝质粒，如 pETBlue™ 和 pTriEx™(1.1, 2, 3 及 4) 系列载体。这种宿主菌由共生的 pLacI 质粒提供 *lac* 阻遏蛋白以保证非诱导条件下的严紧抑制。pETBlue 和 pTriEx 不带有 *lac* 阻遏蛋白基因，要求宿主菌提供 *lac* 阻遏蛋白。请参考 pETBlue 系统操作手册(TB249)和 pTriEx 系统操作手册(TB250)了解 pLacI 宿主菌的使用。

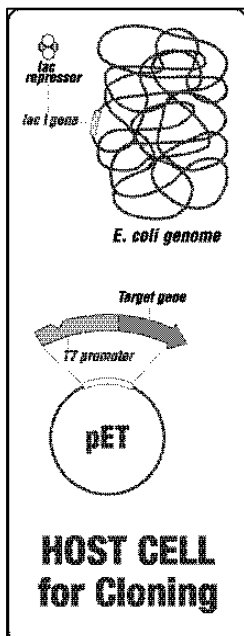
pETcoco™ 系统

另一个降低 λ DE 溶原菌本底表达的办法是采用 pETcoco 载体。这类载体通常以单拷贝存在于细胞中，而一般 pET 载体常常是每个细胞 20–50 拷贝。在只有一个拷贝的情况下，目的基因变得十分稳定，重组和基因重排的可能极小，减少了本底转录水平，仅相当于 pET 载体的 1/40。以 IPTG 诱导 pETcoco 重组蛋白表达，表达水平则与 pET 相近。详细信息参阅 Sektas and Szybalski, 2002 以及操作手册 TB333。

G. 用于克隆的宿主菌

如前所述，pET 系统功能强大，特性之一是能够将目的基因克隆在转录活性极低的条件下，即缺乏 T7 RNA 聚合酶来源的情况下。由于宿主 T7 RNA 聚合酶不是来源于 T7 启动子，所以在缺乏 T7 RNA 聚合酶时，pET 质粒上处于大肠杆菌 T7 启动子转录通读（如果存在）区域的克隆序列仅会有微弱转录，本底表达水平极低。尽管少数情况下（例如无毒目的蛋白），可以直接将重组子克隆到表达宿主菌中，一般不建议采用这种策略。即使 pET 载体上的 T7 启动子只是造成低水平本底表达，通常也会造成宿主生长困难以及表达宿主中质粒不稳定。

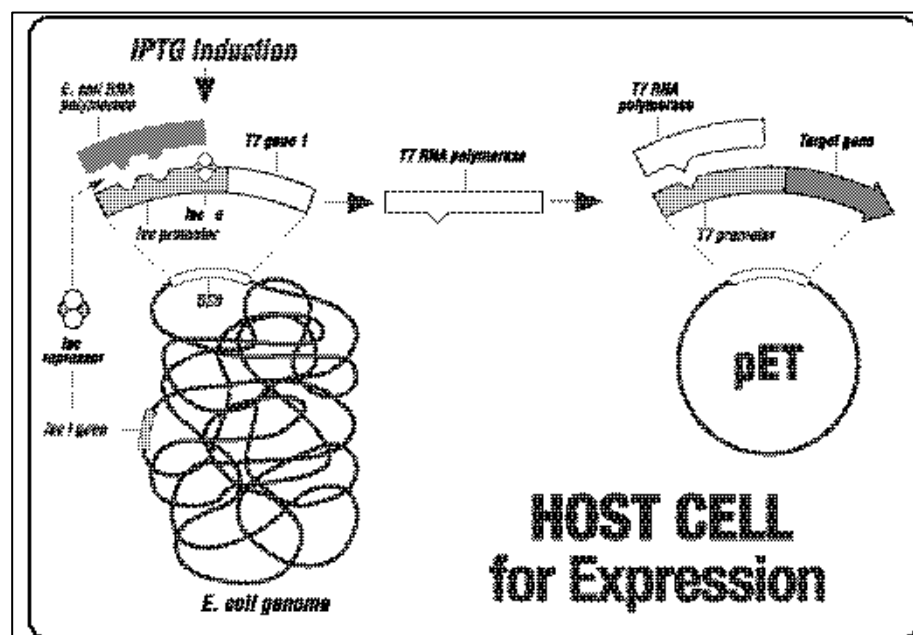
用于克隆的宿主菌通常是 K12 系列 NovaBlue, JM109 以及 DH5 α 。这些菌株是 *recA*⁻ *endA*⁻ 型，转化效率很高，且质粒产量高，适合用于保存带有克隆目的基因的 pET 载体。NovaBlue 还有另外的优点，由于带有可供筛选的 F 因子，便于辅助噬菌体感染，NovaBlue 还可以制备用于突变的单链 DNA（只适合质粒上带有 f1 复制区的情况）。请注意，pET 载体不编码 *lacZ* α -肽，因此也没有蓝/白斑筛选功能。如果要求 T7 表达载体具有蓝/白斑筛选功能，pETBlue 质粒和 NovaBlue 配套使用可以达到要求（见操作手册 TB249）。如果需要，NovaBlue 宿主菌或其它非 DE3 宿主菌均可经噬菌体 CE6 感染而诱导表达。详见噬菌体 CE6 相关描述（第 16 页）。





H. 用于表达的宿主菌

重组质粒转化到带有染色体 T7 RNA 聚合酶基因 (T7 gene 1, 举例见下文) 的大肠杆菌中, 即可开始生产蛋白了。这些菌株都是噬菌体 DE3 的溶原菌, 噬菌体 DE3 是 λ 的一种衍生噬菌体, 带有噬菌体 21 抗性区和 *lacI* 基因, *lacUV5* 启动子, 以及 T7 RNA 聚合酶基因 (Studier and Moffatt, 1986; Novy and Morris, 2001)。这一区段被插入 *int* 基因, 因此阻止了 DE3 在没有辅助噬菌体时整合到染色体上或从染色体切出。一旦形成 DE3 溶原状态, 就只有受 IPTG 诱导的 *lacUV5* 启动子指导 T7 RNA 聚合酶基因转录, 在溶原培养体系中加入 IPTG 诱导 T7 RNA 聚合酶生产, 继而质粒上的目的 DNA 开始转录。还可以选用带有蛋白酶缺陷, 氨基酸营养缺陷型, 溶解性增强, 补充稀有密码子等特性的 DE3 溶原菌。另外, Novagen 提供的 DE3 溶原化试剂盒可以将其它类型的大肠杆菌转换成 DE3 溶原菌。应该注意, 几种常用商业克隆载体都带有 T7 启动子和单独的 *lac* 操纵子/启动子元件用于重组子的蓝/白斑筛选。虽然原则上这些载体可以用于 pET 表达菌株, 实际应用中还是不用为妙。这些载体上的多拷贝 *lac* 操纵子会结合 *lac* 抑制因子, 使 pET 菌株中同样受 *lac* 抑制因子控制的基因部分表达。结果基本的 T7 RNA 聚合酶活性会升高, 使目的基因的稳定性受到影响。这些因素在 pETBlue™ 系统中达到相当好的平衡。



蛋白酶缺陷型

所有 B 型菌株, B834, BL21, BLR, Origami™B, Rosetta™及 Tuner™都缺乏纯化过程中降解蛋白的 *lon* 蛋白酶及 *ompT* 外膜蛋白酶 (Grodberg and Dunn, 1988)。因此, 目的蛋白在这些菌株中的稳定性要高于带有这些蛋白酶的菌株。BL21(DE3) 是用得最多的表达菌。BLR(DE3) 是 A.

Roca (University of Wisconsin) 构建的 BL21 *recA* 衍生菌, 能稳定某些带有重复序列的目的基因。Origami B, Rosetta 和 Tuner 的特点将在后面加以详述。

调节培养体系中所有细胞的表达水平

Tuner™及其衍生菌 (Origami™B 和 Rosetta™) 是 BL21 *lacYI* 删除突变的衍生菌, 能够使整个培养体系中的细胞蛋白表达水平受到均一的调节。lac 透性酶 (*lacYI*) 突变使 IPTG 均一渗透到所有细胞中, 以获得浓度依赖的、均一水平的诱导。通过调节 IPTG 的浓度, 表达水平可以从很低调到相当高, 可以和 pET 载体配合达到完全诱导。低水平表达则更有利于提高溶解难度较大的目的蛋白的溶解度和活性。

二硫键的形成及增加可溶性

许多蛋白要求形成稳定的二硫键才能形成天然空间结构。没有二硫键, 这些蛋白可能被降解或者会形成包涵体。大肠杆菌细胞质中的氧化还原势是不能得到正确折叠的主要原因; 只有转运到细胞周质空间后才形成二硫键。带有谷胱甘肽还原酶 (*gor*) 突变和/或硫氧还蛋白还原酶 (*trxB*) 突变的菌株 (AD494, BL21 *trxB*, Origami, Origami B, Rosetta-gami™) 都能增加细胞质中的二硫键形成。



(Prinz et al., 1997; Aslund et al., 1999)。AD494 (DE3) 和 BL21*trxB* (DE3) 具有 *trxB* 突变，而 Origami (DE3)，Origami B (DE3) 和 Rosetta-gami (DE3) 菌株带有 *trxB* 和 *gor* 双突变。拥有 *trxB* 和 *gor* 突变的菌株比单具 *trxB* 突变的菌株更有可能促进二硫键的形成，使蛋白可溶性更好，活性更高 (Bessette et al., 1999)。研究还显示，即使整体表达水平相似，Origami (DE3) 的活性蛋白要比其它菌株高 10 倍 (Prinz et al., 1997)。应该注意，*trxB* 突变由卡那抗性维持，因此，表达克隆于带卡那抗性的质粒的目的基因不能选用这些菌株。同样道理，要注意 Origami 和 Rosetta-gami 是 K-12 菌株，而 Origami B 是 B 菌株，带有 *ompT* 和 *lon* 蛋白酶和 *lacYI* 突变。

补充稀有密码子

多数氨基酸有不只一个密码子，而不同的生物使用这 61 种密码子的偏爱性不同。每种细胞里，tRNA 种类和数量直接反映了其 mRNA 使用密码子的种类和数量的偏爱性。当外源目的基因 mRNA 在 *E. coli* 里过表达，由于密码子偏爱性不同，会因为缺乏某种或某几种 tRNA，直接导致翻译终止或错误。tRNA 不足会造成翻译停顿，早期翻译停止，移码突变，和氨基酸错掺等问题。Rosetta™ 菌株是经过修饰，专用于带有大肠杆菌稀有密码子的真核蛋白表达的菌株 (Brinkmann et al., 1989; Seidel et al., 1992; Kane, 1995; Kurland and Gallant, 1996)。经提高稀有 tRNA 水平，这些蛋白的表达会大幅度提高 (Brinkmann et al., 1989; Seidel et al., 1992; Rosenberg et al., 1993; Del Tito et al., 1995)。Rosetta 菌株能够由一种氯霉素抗性的、与 pET 相容的质粒提供 AUA, AGG, AGA, CUA, CCC 和 GGA 的 tRNA。所以这类菌株能够明显改善大肠杆菌中由于稀有密码子造成的表达限制 (Novy et al., 2001)。这些 tRNA 基因有自身启动子。pLysS 和 pLacI Rosetta 菌株其稀有密码子的 tRNA 基因在同类质粒上，这些质粒分别带有 T7 溶菌酶和 *lac* 抑制因子基因。Rosetta 系列源自 BL21 *lacYI* 的突变株 Tuner™。RosettaBlue™ 和 Rosetta-gami™ 菌株源自 NovaBlue 和 Origami™ 菌株，并与其具有类似的特性。

硒代甲硫氨酸标记

B834 菌株是一种甲硫氨酸缺陷型菌株，也是 BL21 的亲本。B834 适用于高效特异活性 ³⁵S-met 标记和硒代甲硫氨酸标记的结晶学研究 (Wood, 1966; Leahy, 1992)。已经用 B834 (DE3) 表达了好几种目的蛋白，产量明显高于 BL21 (DE3)，显示了这种亲本在某些方面仍具有一些优势 (Doherty, 1995)。



pET 系统各种宿主菌特性列表

本表列出了 pET 系统常用的克隆和表达菌株的基因型；Novagen 提供甘油菌和直接用于转化的感受态细胞。甘油菌和感受态细胞的货号可以在 51 至 54 页查到。

菌株	来源	基因型	描述/应用	抗生素抗性 ¹
AD494	K-12	? <i>ara-leu7697</i> ? <i>lacX74</i> ? <i>phoAPvuII phoR</i> ? <i>malF3</i> F'[<i>lac^f(lac^f)pro</i>] <i>trxB::kan</i>	<i>trxB⁻</i> 非表达宿主菌 ² ；在 <i>E. coli</i> 细胞质中形成二硫键	卡那霉素 (15 μg/ml)
AD494(DE3)	K-12	? <i>ara-leu7697</i> ? <i>lacX74</i> ? <i>phoAPvuII phoR</i> ? <i>malF3</i> F'[<i>lac^f(lac^f)pro</i>] <i>trxB::kan</i> (DE3)	<i>trxB⁻</i> 表达宿主菌 ³ ；在 <i>E. coli</i> 细胞质中形成二硫键	卡那霉素 (15 μg/ml)
AD494(DE3)pLysS	K-12	? <i>ara-leu7697</i> ? <i>lacX74</i> ? <i>phoAPvuII phoR</i> ? <i>malF3</i> F'[<i>lac^f(lac^f)pro</i>] <i>trxB::kan</i> (DE3) pLysS	<i>trxB⁻</i> 高严谨表达宿主菌 ^{3,4} ；在 <i>E. coli</i> 细胞质中形成二硫键	卡那霉素 (15 μg/ml) 氯霉素 (34 μg/ml)
B834	B	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm met</i>	<i>met</i> 营养缺陷型，BL21 的母本，对照非表达宿主菌 ²	无
B834(DE3)	B	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm met</i> (DE3)	<i>met</i> 营养缺陷型，BL21 的母本，常规表达宿主菌 ³ ， ³⁵ S- <i>met</i> 标记	无
B834(DE3)pLysS	B	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm met</i> (DE3) pLysS	<i>met</i> 营养缺陷型，BL21 的母本，高严谨表达宿主菌 ^{3,4} ， ³⁵ S- <i>met</i> 标记	氯霉素 (34 μg/ml)
BL21	B	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i>	对照非表达宿主菌 ²	无
BL21(DE3)	B	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	常规表达宿主菌 ³	无
BL21(DE3)pLysS	B	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cm ^R)	高严谨表达宿主菌 ^{3,4}	氯霉素 (34 μg/ml)
BL21 <i>trxB</i> (DE3)	B	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm <i>trxB15::kan</i> (DE3)</i>	常规表达宿主菌 ³ ；在 <i>E. coli</i> 细胞质中形成二硫键	卡那霉素 (15 μg/ml)
BL21 <i>trxB</i> (DE3)pLysS	B	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm <i>trxB15::kan</i> (DE3) pLysS (Cm^R)</i>	高严谨表达宿主菌 ^{3,4} ；在 <i>E. coli</i> 细胞质中形成二硫键	卡那霉素 (15 μg/ml) 氯霉素 (34 μg/ml)
BLR	B	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> ? (<i>srI-recA</i>)306::Tn10 (Tc ^R)	<i>recA⁻</i> 非表达宿主菌 ² ，推荐用于带有串联序列的质粒	四环素 (12.5 μg/ml)
BLR(DE3)	B	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> ? (<i>srI-recA</i>)306::Tn10 (Tc ^R) (DE3)	<i>recA⁻</i> 表达宿主菌 ³ ，推荐用于带有串联序列的质粒	四环素 (12.5 μg/ml)
BLR(DE3)pLysS	B	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> ? (<i>srI-recA</i>)306::Tn10 (DE3) pLysS	<i>recA⁻</i> 高严谨表达宿主菌 ^{3,4} ，推荐用于带有串联序列的质粒	四环素 (12.5 μg/ml) 氯霉素 (34 μg/ml)
HMS174	K-12	F ⁻ <i>recA hsdR(r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) Rif^R</i>	对照非表达宿主菌 ²	利福平 (200 μg/ml)
HMS174(DE3)	K-12	F ⁻ <i>recA hsdR(r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) Rif^R</i> (DE3)	<i>recA⁻</i> K-12 表达宿主菌 ³	利福平 (200 μg/ml)
HMS174(DE3)pLysS	K-12	F ⁻ <i>recA hsdR(r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) Rif^R</i> (DE3) pLysS	<i>recA⁻</i> K-12 高严谨表达宿主菌 ^{3,4}	氯霉素 (34 μg/ml) 利福平 (200 μg/ml)
NovaBlue	K-12	<i>endA1 hsdR17(r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) supE44 thi-1 recA1</i> <i>gyrA96 relA1 lac</i> F'[<i>proA⁺ B⁺ lac^fZ? M15::Tn10(Tc^R)</i>]	非表达宿主菌 ² ，常规克隆，制备质粒	四环素 (12.5 μg/ml)
NovaBlue(DE3)	K-12	<i>endA1 hsdR17(r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) supE44 thi-1 recA1</i> <i>gyrA96 relA1 lac</i> F'[<i>proA⁺ B⁺ lac^fZ? M15::Tn10(Tc^R)</i>] (DE3)	<i>recA⁻ endA⁻</i> K-12 <i>lacI^f</i> 表达宿主菌 ³ 推荐用于 NovaTope- [®] 系统	四环素 (12.5 μg/ml)
Origami™ B	B	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1 ahpC</i> <i>gor522::Tn10 (Tc^R) <i>trxB::kan</i></i>	对照非表达宿主菌 ²	四环素 (12.5 μg/ml) 卡那霉素 (15 μg/ml)
Origami B(DE3)	B	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1 ahpC</i> <i>gor522::Tn10 (Tc^R) <i>trxB::kan</i></i> (DE3)	常规表达 ³ 宿主菌；包括 Tuner <i>lac</i> 透性酶，细胞质二硫化物还原途径有 <i>trxB/gor</i> 两个突变，增加 <i>E. coli</i> 细胞质中二硫键的形成	四环素 (12.5 μg/ml) 卡那霉素 (15 μg/ml)

pET System Manual 系统介绍



菌株	来源	基因型	描述/应用	抗生素抗性 ¹
Origami B(DE3) pLysS	B	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1 ahpC gor522::Tn10 (Tc^R) trxB::kan (DE3) pLysS (Cm^R)</i>	高度严谨 ^{3,4} 表达宿主菌, 包括 Tuner <i>lac</i> 透性酶突变以及 <i>trxB/gor</i> 突变帮助细胞质内二硫键形成	四环素 (12.5 μg/ml) 卡那霉素 (15 μg/ml) 氯霉素 (34 μg/ml)
Origami™ ⁵	K-12	? <i>ara-leu7697 ? lacX74 ? phoAPvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F[lac⁺(lac^f)pro] gor522::Tn10 (Tc^R) trxB::kan</i>	对照非表达宿主菌 ²	四环素 (12.5 μg/ml) 卡那霉素 (15 μg/ml)
Origami(DE3) ⁵	K-12	? <i>ara-leu7697 ? lacX74 ? phoAPvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F[lac⁺(lac^f)pro] gor522::Tn10 (Tc^R) trxB::kan (DE3)</i>	常规表达 ³ 宿主菌; 细胞质二硫化物还原途径有两个突变, 增加 <i>E. coli</i> 细胞质中二硫键的形成	四环素 (12.5 μg/ml) 卡那霉素 (15 μg/ml)
Origami(DE3)pLysS ⁵	K-12	? <i>ara-leu7697 ? lacX74 ? phoAPvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F[lac⁺(lac^f)pro] gor522::Tn10 (Tc^R) trxB::kan (DE3) pLysS (Cm^R)</i>	高度严谨 ^{3,4} 表达宿主菌, 细胞质二硫化物还原途径有两个突变, 可以增加 <i>E. coli</i> 细胞质中二硫键的形成	四环素 (12.5 μg/ml) 卡那霉素 (15 μg/ml) 氯霉素 (34 μg/ml)
Rosetta™	B	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1 pRARE⁶ (Cm^R)</i>	对照非表达宿主菌 ²	氯霉素 (34 μg/ml)
Rosetta(DE3)	B	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1 (DE3) pRARE⁶ (Cm^R)</i>	常规表达 ³ 宿主菌; <i>lac</i> 透性酶突变, 可以控制表达水平, 提供稀有密码子 tRNAs	氯霉素 (34 μg/ml)
Rosetta(DE3)pLysS	B	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1 (DE3) pLysSRARE⁶ (Cm^R)</i>	高度严谨 ^{3,4} 表达宿主菌, <i>lac</i> 透性酶突变, 可以控制表达水平, 提供稀有密码子 tRNAs	氯霉素 (34 μg/ml)
RosettaBlue™	K-12	<i>endA1 hsdR17(r_{K12}⁻ m_{K12}⁻) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F[proA⁺B⁺ lac^fZ? M15::Tn10(Tc^R)] pRARE⁶ (Cm^R)</i>	对照非表达宿主菌 ²	四环素 (12.5 μg/ml) 氯霉素 (34 μg/ml)
RosettaBlue(DE3)	K-12	<i>endA1 hsdR17(r_{K12}⁻ m_{K12}⁻) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F[proA⁺B⁺ lac^fZ? M15::Tn10(Tc^R)] (DE3) pRARE⁶ (Cm^R)</i>	<i>recA⁻ endA⁻</i> K-12 <i>lacI^q</i> 常规表达 ³ 宿主菌, 提供稀有密码子 tRNAs	四环素 (12.5 μg/ml) 氯霉素 (34 μg/ml)
RosettaBlue™DE3) pLysS	K-12	<i>endA1 hsdR17(r_{K12}⁻ m_{K12}⁻) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F[proA⁺B⁺ lac^fZ? M15::Tn10(Tc^R)] (DE3) pLysSRARE⁶ (Cm^R)</i>	<i>recA⁻ endA⁻</i> K-12 <i>lacI^q</i> 高度严谨 ^{3,4} 表达宿主菌, 提供稀有密码子 tRNAs	四环素 (12.5 μg/ml) 氯霉素 (34 μg/ml)
Rosetta-gami™ ⁵	K-12	? <i>ara-leu7697 ? lacX74 ? phoAPvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F[lac⁺(lac^f)pro] gor522::Tn10 (Tc^R) trxB::kan pRARE⁶ (Cm^R)</i>	对照非表达宿主菌	四环素 (12.5 μg/ml) 卡那霉素 (15 μg/ml) 氯霉素 (34 μg/ml)
Rosetta-gami(DE3) ⁵	K-12	? <i>ara-leu7697 ? lacX74 ? phoAPvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F[lac⁺(lac^f)pro] gor522::Tn10 (Tc^R) trxB::kan (DE3) pRARE⁶ (Cm^R)</i>	常规表达 ³ 宿主菌; 细胞质二硫化物还原途径有两个突变, 可以增加 <i>E. coli</i> 细胞质中二硫键的形成. 提供稀有密码子 tRNAs	四环素 (12.5 μg/ml) 卡那霉素 (15 μg/ml) 氯霉素 (34 μg/ml)
Rosetta-gami (DE3)pLysS ⁵	K-12	? <i>ara-leu7697 ? lacX74 ? phoAPvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F[lac⁺(lac^f)pro] gor522::Tn10 (Tc^R) trxB::kan (DE3) pLysSRARE⁶ (Cm^R)</i>	高度严谨 ^{3,4} 表达宿主菌; 细胞质二硫化物还原途径有两个突变, 可以增加 <i>E. coli</i> 细胞质中二硫键的形成. 提供稀有密码子 tRNAs	四环素 (12.5 μg/ml) 卡那霉素 (15 μg/ml) 氯霉素 (34 μg/ml)
Tuner™	B	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1</i>	对照非表达宿主菌	无
Tuner(DE3)	B	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1 (DE3)</i>	常规表达 ³ 宿主菌; <i>lac</i> 透性酶突变, 可以控制表达水平	无
Tuner(DE3)pLysS	B	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1 (DE3) pLysS (Cm^R)</i>	高度严谨 ^{3,4} 表达宿主菌; <i>lac</i> 透性酶突变, 可以控制表达水平	氯霉素 (34 μg/ml)



1. 必须加入筛选目标质粒的相应抗生素?
2. 这里非表达是指该菌株没有 T7 RNA 聚合酶基因? 因此不能表达 T7 启动子控制的目的基因? 这些菌株可以表达 *E. coli* 启动子 *lac?* *tac?* *trc* 及 *trp* 或以 λ CE6 感染来进行 pET 表达?
3. 表达即指该菌株是 λ DE3 溶原菌? 例如带有 *lacUV5* 控制的 T7 RNA 聚合酶? 因此可以用于 T7 启动子驱动的目的基因表达?
4. 高度严谨意指该菌株带有 pLysS? 一种与 pET 共存的生产 T7 裂解酶的质粒? 可以减少目的基因的本底表达? pLysE 宿主菌能提供更为严谨的控制? Novagen 提供这两种甘油菌产品?
5. 原有的 *trxB/gor* 双突变(Stewart, 1998)要求生长培养基中有还原剂以支持正常生长? Origami™菌株来源于(FA113)带有 *ahpC* 单突变的菌株? 不在培养基中补加还原剂也能正常生长 (Bessette et al., 1999; Ritz et al., 2001)?
6. PRARE 和 pLysSRARE 编码 tRNA 基因 *argU?* *araW?* *ileX?* *glyT?* *leuW?* *proL?* *metT?* *thrT?* *tyrU* 及 *thrU?* 稀有密码子 AGG? AGA? AUA? CUA? CCC 和 GGA 因此得以补充 (Novy et al., 2001)?

I. 抗生素抗性

不同的 pET 载体带有不同的筛选标记, 如(氨苄青霉素抗性, 缩写为 Ap 或 *bla* 即 -内酰胺酶)以及 *kan* (卡那霉素抗性), 参见第7页列表。这两种筛选非常常用, 但我们就带有 -内酰胺酶基因的载体的使用还是提出了一些指导意见(请参见第 v 章 优化表达 部分)。与氨苄抗性广泛用于筛选各种克隆载体不同, 卡那霉素抗性更常用在一些特定的情况下, 例如要求表达蛋白符合 GMP 标准, 或需亚克隆的目的基因来自氨苄抗性载体等。由于分泌的 -内酰胺酶以及细菌发酵造成的 pH 值降低都会使氨苄青霉素降解, 进而使筛选失败。为了避免药物抗性的损失, 通常采用更换新鲜的氨苄培养基的方法或干脆采用对低 pH 不敏感的羧苄青霉素替代。

kan^R 载体与大多数 *amp^R* pET 载体的另一个不同是药物抗性基因转录方向不同。在 *kan^R* pET 载体中, *kan* 基因与 T7 启动子反向, 因此诱导 T7 启动子并不会增加 *kan* 基因产物产量。相反, *amp^R* pET 载体的 -内酰胺酶基因位于 T7 启动子的下游并与之同向。所有的 pET 翻译载体都带有位于 -内酰胺酶基因前的天然 T7 转录终止子(T₇)。但是这个终止子仅有大约 70% 的效率, T7 RNA 聚合酶仍能读通而产生目的 RNA 以及少量 -内酰胺酶 RNA。这样一来诱导培养体系中仍会积累 -内酰胺酶。基于这种考虑, pET-43.1 和 pET-44 载体上的 -内酰胺酶基因方向已经被翻转, 从而使 T7 RNA 聚合酶读通时 -内酰胺酶基因产物也不增加。

J. CE6 噬菌体

表达毒性基因的另一个方法是通过 CE6 噬菌体感染获得 T7 RNA 聚合酶。CE6 是一种具有受噬菌体 *p_L* 和 *p_R* 启动子控制的克隆聚合酶、热敏 *cI857* 抑制物以及 *Sam7* 裂解突变的 λ 重组物(Studier and Moffatt, 1986)。当 CE6 感染某种宿主菌时, T7 RNA 聚合酶能非常活跃地转录目的 DNA, 而噬菌体的正常发育却因此受到抑制。尽管采用 DE3 溶原菌较为方便, 本方法更适合用于目的基因产物毒性较高的情况。感染前细胞中没有 T7 RNA 聚合酶存在, 因此该方法可以用于表达受 T7 启动子控制的目的基因。Novagen 也单独提供 CE6 噬菌体产品(参见 TB007)。



K. 诱导对照

pET 系统的每个 pET 载体及其表达系统都配有采用与其启动子、筛选标记、及其它元件一致的诱导对照菌株，以便检查试验效果。诱导对照不能用于克隆。菌株是带有编码 β -半乳糖苷酶的 pET 质粒的 DE3 溶原菌甘油储存物，很容易通过分光光度法测定(除了对照 H、J、L、N 及 O.1，这些不带有插入片段)。下表列出了各种诱导对照菌株及其对应的 pET 载体。关于 β -半乳糖苷酶分析的详细情况请参考第 50 页。

对照	载体	宿主菌	筛选	启动子	融合标签	蛋白酶位点	插入子 (蛋白大小)	载体系列	货号
A	pET-14b	BL21(DE3)pLysS	amp cam	T7	His•Tag [®]	T	β -gal 118kDa	pET-3, 5, 12, 14b, 17b, 17xb, 20b, 23	69674
B	pET-15b	BL21(DE3)pLysS	amp cam	T7lac	His•Tag	T	β -gal 118kDa	pET-11, 15b, 21, 22b, 25b	69257
C	pET-16b	BL21(DE3)pLysS	amp cam	T7lac	His•Tag	X	β -gal 119kDa	pET-16b	69675
D	pET-19b	BL21(DE3)pLysS	amp cam	T7lac	His•Tag	E	β -gal 119kDa	pET-19b	69676
E	pET-28b(+)	BL21(DE3)	kan	T7lac	His•Tag T7•Tag [®]	T	β -gal 119kDa	pET-9, 24, 26b, 27b, 28	69258
F	pET-29b(+)	BL21(DE3)	kan	T7lac	S•Tag [™]	T	β -gal 119kDa	pET-29	69259
G	pET-30b(+)	BL21(DE3)	kan	T7lac	His•Tag S•Tag	T, E	β -gal 121kDa	pET-30	69554
H	pET-31b(+)	BLR(DE3)pLysS	amp cam, tet	T7lac	KSI		none 14.8kDa	pET-31b	69966
J	pET-32a(+)	BL21(DE3)	amp	T7lac	Trx•Tag [™] His•Tag S•Tag	T, E	none 20.4kDa	pET-32	69030
K	pET-34b(+)	BL21(DE3)	kan	T7lac	CBD _{cas} •Tag S•Tag	T, E	β -gal 138kDa	pET-34b, 35b, 36b, 37b, 38b	70125
L	pET-39b(+)	BL21(DE3)	kan	T7lac	DsbA•Tag [™] His•Tag S•Tag	T, E	none 32.2kDa	pET-39b, 40b	70463
M	pET-33b(+)	BL21(DE3)	kan	T7lac	His•Tag PKA site T7•Tag	T	β -gal 120kDa	pET-33b	70514
N	pET-41b(+)	BL21(DE3)	kan	T7lac	GST•Tag [™] His•Tag S•Tag	T, E	none 35.6kDa	pET-41, 42	70535
O.1*	pET-43.1b(+)	BL21(DE3)	amp	T7lac	Nus•Tag [™] His•Tag S•Tag HSV•Tag [®]	T, E	none 66.4kDa	pET-43.1, 44	70965

缩写：amp = 氨苄或羧苄青霉素，kan = 卡那霉素，cam = 氯霉素，tet = 四环素

T = 凝血酶，X = Xa 因子，E = 肠激酶

* 诱导对照 O (货号 70833-3) 与 O.1 特点一致，但额外配有 pET-43b(+).



II. 建立原核表达体系的基本知识

A. pET 系统操作流程

主要步骤	操作
制备 pET 载体	1. 用限制性酶消化, 去磷酸化, 或使用 LIC 载体 2. 胶纯化(或使用 LIC 载体)
制备插入 DNA	1. 质粒纯化/PCR 2. 限制性消化或制备 LIC 粘端 3. 胶纯化
将插入片段克隆到 pET 载体上	1. 插入片段与 pET 载体连接或退火 2. 转化非表达型宿主菌(例如 NovaBlue) 3. 筛选阳性克隆; 菌落 PCR, 制备质粒 DNA, 通过测序确定阅读框, 或进行体外转录/翻译
转化表达宿主菌	1. 转化带有 T7 RNA 聚合酶基因的菌株 (λ DE3 溶原菌 lysogen) 或以 λ CE6 感染非 DE3 宿主菌
诱导/优化表达目的蛋白	1. 检测质粒稳定性(选择性操作) 2. 确定细胞及亚细胞组分, 表达时间和温度条件; 分析蛋白溶解性及活性 3. 用 SDS-PAGE、Western 印迹、定量分析, 确定目的蛋白
放大试验	1. 放大培养 2. 制备粗提物
纯化目的蛋白	3. 亲和纯化 4. 切去融合标签并去除蛋白酶(如果必要)



B. 生长培养基

适于 pET 系统宿主菌生长及表达目的 DNA 的生长培养基种类很多，包括 LB，TB，M9 及 M9ZB 等。以下列出其配方及储存溶液。

LB	
每升： 10 g Bacto® 蛋白胨 5 g 酵母抽提物 10 g NaCl •用 1N NaOH 将 pH 调至 7.5 •高压灭菌	
TB (Sambrook et al., 1989)	磷酸钾缓冲液
每升： 900 ml 去离子水 12 g Bacto 蛋白胨 24 g 酵母抽提物 4 ml 甘油 •高压灭菌，冷却至 60°C •加 100 ml 灭菌磷酸钾缓冲液	每升： 23.1 g KH ₂ PO ₄ 125.4 g KH ₂ PO ₄ •高压灭菌
M9	20X M9 缓冲液
每升： 50 ml 20X M9 缓冲液 20 ml 20% 葡萄糖 1 ml 1 M MgSO ₄ 0.5 g NaCl 930 ml 灭菌去离子水	每升： 20 g NH ₄ Cl 60 g KH ₂ PO ₄ 120 g Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O •高压灭菌
M9ZB (Studier et al., 1990)	10X M9 缓冲液
每升： 10 g N-Z-amine A (Quest) 5 g NaCl •高压灭菌并冷却 •加 100 ml 10X M9 缓冲液，1 ml 1M MgSO ₄ ，10 ml 40% 葡萄糖 (取自灭菌存储液)	每升： 10 g NH ₄ Cl 30 g KH ₂ PO ₄ 60 g Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O •高压灭菌



储存溶液	制备方法	货号
100 mM IPTG	将 2.38 g IPTG溶于 100 ml 去离子水。过滤除菌并储存于-20°C。	70527-3*
羧苄青霉素 (二钠盐)	去离子水溶解, 50 mg/ml。储存于-20°C。工作浓度 50 μg/ml。	69101-3
氨苄青霉素 (氯化物)	去离子水溶解, 25 mg/ml。储存于-20°C。工作浓度 50 μg/ml。	171254 (Calbiochem)
氯霉素	乙醇溶解, 50 mg/ml。储存于-20°C。工作浓度 34 μg/ml。	220551 (Calbiochem)
卡那霉素(硫酸盐)	去离子水溶解, 30 mg/ml。储存于-20°C。工作浓度: 带 kan ^R 质粒细胞 30 μg/ml, 带染色体 kan ^R 基因的细胞 15 μg/ml (AD494, BL21 <trxb, b,="" origami="" origami™,="" rosetta-gami™)。<="" td=""> <td>420311 (Calbiochem)</td> </trxb,>	420311 (Calbiochem)
四环素	乙醇溶解, 12.5 mg/ml。储存于-20°C。工作浓度 12.5 μg/ml。	58346 (Calbiochem)
利福平	67% 甲醇、0.17 N NaOH 溶解, 10 mg/ml。5 天内用, 工作浓度 200 μg/ml, 避光保存。	557303 (Calbiochem)
葡萄糖	20% (w/vol) D-葡萄糖水溶液。高压灭菌, 室温存放。和抗生素一起加入 LB 琼脂, 终浓度 0.5-1%。	346352 (Calbiochem)

*100 mM IPTG 溶液

C. 宿主菌的保存

长期存放菌株和 pET 重组子应保存于甘油中。但是要注意高浓度甘油(> 10%)会导致质粒不稳定。

准备宿主菌和 pET 重组子培养物:

1. 在 250 ml 培养瓶带有相应抗生素的 50 ml 培养基中接入单菌落。
2. 37°C 剧烈摇晃培养直至 OD₆₀₀ 达到 0.6-0.8。
3. 取 0.9 ml 移至冷冻管, 加 0.1 ml 80% 甘油。
4. 充分混和, -70°C 存放。

在冷冻带有质粒(特别是那些不稳定倾向的质粒)的菌株时, 应该进行滴度检测以确定绝大多数培养细胞带有质粒(详见优化表达部分)。

接种冷冻培养菌:

1. 用灭菌枪头或塑料环刮取或融化取几毫升培养物。
2. 琼脂板划线或接种液体培养基[包含适当的抗生素]。
3. 将剩下的未融化的培养物重新放回-70°C 冰箱。



D. 制备载体

制备载体，采用限制性酶及对应的缓冲液和反应条件，许多酶可以共用一种缓冲液和反应体系。

- 应该注意，不同的酶酶切效率不同，特别是两个酶切位点很接近的情况。一般来说，酶切位点间隔在 10 bp 以上而又共用缓冲液的酶可以在同一反应体系中使用。如果其中某个酶酶切效率很低，或不能共用缓冲液，或位点间隔少于 10 bp，就只能分步酶切了。首先应该用酶切效率最差的酶，经电泳跑胶验证后再做第二个酶切反应。
- 有些限制性酶有“星号活性”，识别序列不太严谨，会降低酶切专一性。导致星号活性的反应条件包括甘油浓度过高(> 5%)，高 pH 及较低的离子强度。

注意：正如第一部分已经提到的一样，本系统克隆 PCR 产物也可不经限制性酶切消化，采用不依赖连接反应的克隆方法(LIC)，Novagen 提供 *Ek/LIC* 和 *Xa/LIC* 载体试剂盒。具体操作方法见对应操作手册。

- 如果克隆到一个位点，要在消化后进行去磷酸化以降低自连载体的非重组子背景。请依据厂商说明使用分子生物级小牛小肠来源(供应商 Calbiochem，货号 524576)或虾碱性磷酸酶。
- 将双酶切的载体去磷酸化也非常有用，特别是当两个酶切位点十分接近或其中一个酶酶切效率较差时尤其值得推荐。这样可以大幅度降低由于酶切不完全造成的非重组背景，而电泳胶分析通常无法预测。
- 建议消化后通过电泳分离纯化载体，去除残余的缺刻或超螺旋质粒，再进行插入连接反应——这些质粒转化效率较线性质粒要高得多。虽然这一步是选择性操作，但是由于可以节省大量的筛选时间和精力，通常还是建议做凝胶电泳分离纯化。Novagen 的 SpinPrep™ 胶纯化试剂盒是方便好用的 DNA 片段回收试剂盒。

载体消化和胶纯化：

1. 准备反应体系：

3 μg	pET 载体
3 μl	10X 限制性酶切缓冲液
10–20 U	每种限制性酶(考虑是否共用缓冲液；酶的总体积不要超过反应体系的 10%，以避免甘油浓度过高。
3 μl	1 mg/ml 乙酰 BSA (选择使用)
x μl	用无核酸酶纯水补足总体积
30 μl	总体积

2. 温育(通常为 37° C) 2–4 小时。
3. 取 3 μl 样品和 Perfect DNA™ Markers 一起上样跑琼脂糖胶，检测消化反应进行的程度。
4. 消化完全后，在消化反应系统中加入小牛小肠碱性磷酸酶(供应商 Calbiochem，货号 524576)。该酶在大多数限制性酶缓冲液中有活性，详见下文。酶的正确用量非常关键；酶量太大会导致大量难以去除的杂产物，给后续操作造成许多麻烦。3 μg 典型 pET 载体(5 kbp)相当于 2 pmol DNA 末端(线性质粒)，或相当于 4 pmol 末端(双酶切质粒)。我们建议每 pmol 末端用 0.05 单位的碱性磷酸酶。用前用水或 50 mM Tris-HCl, pH 9.0 新鲜配置稀释酶液。
5. 37° C 静置 30 min。
6. 在反应体系中加入上样缓冲液，将全部样品加入大样品槽(0.5–1.0 cm 宽)上跑含有 0.5 μg/ml EB 的 1% 琼脂糖胶。跑电泳直至超螺旋质粒、带缺刻质粒和线性质粒各自分开。建议在邻近泳道上同时加上未切割载体 DNA，以便确认未消化的质粒 DNA。
7. 长波长紫外线下观察 DNA，并用干净刀片切下条带。不要将胶长时间暴露于紫外光下，以免在 DNA 上产生缺刻或双链缺口。
8. 从胶中回收 DNA。可以选择 SpinPrep™ 胶回收试剂盒(货号 70852-3)。将终产物重悬，总体积 30 μl (通常为 50 ng/μl DNA)。DNA 的质量可以用 Molecular Probes 公司的 PicoGreen 试剂盒进行分光光度法检验。预计连接反应的得率约为 50%。
9. 将处理好的载体存放于 -20° C 备用。

注意：如果载体不是来自于胶纯化，或胶纯化不能去除残余的碱性磷酸酶，可以接着处理纯化产物：1 体积 TE/酚，1 体积 TE/酚:CIAA (1:1; CIAA 即氯仿:异丙醇 24:1)，以及 1 体积 CIAA。然后用 0.1 体积 3 M 醋酸钠及 2 体积乙醇沉淀。12,000 x g，10 分钟，用 70% 乙醇淋洗，空气干燥，30 μl TE 重溶。离心时加入 Pellet Paint® 共沉淀物 (2 μl) 可以帮助看到沉淀。



E. 制备插入片段

限制性消化和胶纯化是制备插入片段的常规方法。请注意，从其它与 pET 载体有一致筛选标记的载体亚克隆（即使是 PCR 法），需要胶纯化目的片段去除原载体，以便得到很高的转化效率。10 pg 左右的超螺旋质粒污染（例如琼脂糖胶上都看不见的微量 DNA）都会造成大量假阳性克隆，而非希望得到的 pET 亚克隆。

PCR 可用于分离/修饰 pET 载体克隆的目的基因。采用这种方法，可以在设计引物时考虑 (1) 分离已翻译的 cDNA 序列片段，(2) 加上方便的限制性酶切位点或 LIC 粘端，或 (3) 使编码区处于正确的阅读框。一般来说，引物至少是 15（多为 18-21）个核苷酸与目的序列互补，GC 含量约为 50%，限制性酶切位点 5' 端有 3-10（依不同的酶而异）“间隔”保护核苷酸，使消化效率更高。

采用 PCR 方法插入片段有引入突变的风险。注意以下要点可以最大限度地降低发生错误的几率：

- ? 采用高保真酶，例如 HiFi，热启动型及 XL KOD DNA 聚合酶。
- ? 尽量减少 PCR 循环数
- ? 增加模板 DNA 浓度
- ? 增加引物浓度



III. 在 pET 载体中插入片段

本节介绍在 pET 载体中克隆外源片段的过​​程。该过程包括连接和转化非表达宿主菌，以及分析构建成功的重组质粒。Novagen 的 Clonable 试剂盒(货号 70526-3)包括预试连接混和物和高效感受态细胞，可以简便、高效的进行连接反应，适用于任何类型末端的插入片段与载体的连接和转化(参见操作手册 TB233)。证实重组质粒构建成功后，质粒可转入表达型菌株进行蛋白表达生产。

A. 连接反应

成功连接的操作指南

- 以插入片段为 2-4 个碱基粘性末端的典型连接反应为例，在 20 μ l 的反应体系中，pET 载体为 50-100ng (0.015-0.03 μ mol)，0.2 μ mol (500bp 的插入片段为 50ng) 插入片段，将下列组分加入 1.5ml 离心管中(在 DNA 连接试剂盒中单独提供这些成分，货号 69838-3)或是用 Clonables™ 2X 连接预混和物(货号 70573-3)，最后加入连接酶。

2 μ l	10X 连接缓冲液 (200 mM Tris-HCl pH 7.6, 100 mM MgCl ₂ , 250 μ g/ml 乙酰化 BSA)
2 μ l	100 mM DTT
1 μ l	10 mM ATP
2 μ l	50 ng/ μ l 预制 pET 载体
1 μ l	T4 DNA 连接酶, 稀释 (用连接酶稀释缓冲液) 0.2-0.4 Weiss 单位/ μ l
x μ l	预制目的基因插入片段 (0.2 μ mol)
y μ l	加入无菌水(不含核酶)至总体积
20 μ l	总体积

- 最后加入连接酶，以小枪头轻柔混匀。16 反应 2 小时至过夜。同时设立不加插入片段的对照，以测定假阳性背景。

注意： 若为平末端连接，加入更多 10 \times 连接酶，降低 ATP 浓度至 0.1mM，16 反应 6-16 小时或者室温温育 2 小时。

B. 转化

最初的克隆需要在 *recA* 菌株中操作，如 NovaBlue 或其他一些类似的缺乏 T7 RNA 聚合酶基因的宿主菌。这类菌株有利于增加质粒单体产量，达到测序要求，并且将目的基因的克隆和蛋白表达分开。这种分离对于解决之后过程中可能遇到的困难意义重大。

前述各种用于克隆和表达 pET 载体的菌株都可以用标准方法制备感受态。BL21(表达菌株)及其衍生型转化效率仅为其他菌株的 1/10。为了实验方便和结果的一致性，Novagen 提供感受态形式的各种相关菌株，可直接进行高效转化。

高质量连接反应混和物中的 DNA 可以直接转化 Novagen 的感受态细胞(20 μ l 菌液中加入不超过 1 μ l 的连接产物)。转化之前无须将连接酶灭活。使用常规方法抽提的质粒也可以得到满意的结果；然而，为了得到最大的转化效率，样品 DNA 中应该去除酚、乙醇、盐、蛋白及去污剂，并溶于 TE 缓冲液(10nM Tris-HCl pH8.0，1mM EDTA)或水中。



Novagen的感受态细胞以每管 0.2ml 规格提供。一个标准转化反应需要 20 μ l 细胞，所以每管细胞可以做 10 次转化。Singles™感受态细胞提供 50 μ l 每管的包装，适用于每次 50 μ l 的转化反应。注意 Singles™与普通细胞的操作步骤有几步不相同。Novagen 的 NovaBlue 和 BL21(DE3) 感受态细胞同时提供 96 孔板高通量形式的 HT96™感受态细胞(参见操作手册 TB313)。

操作小诀窍

1. 收到感受态细胞后，确认细胞保持冰冻状态，运输所用的包装盒中有干冰。迅速将其保存于 -70 或更低温度的冰箱之中。为了达到最佳效果，感受态细胞在使用之前不可融化。
2. 尽量保证只接触管上部及管盖以免细胞受热。尽量将细胞置于冰上。
3. 轻轻弹打小管 1-3 次以混和细胞。千万不要振荡。
4. 为避免 0.2ml 包装的感受态多次冻融，在第一次融化之后分装细胞重新置于 -70 冰箱之中 (Singles 感受态提供 50 μ l 每管的包装无需分装)。在打开保存管之前，迅速将管从冰上取出，轻弹 1-2 次混和细胞。从菌液中部取出 20 μ l，迅速将保存管重新置于冰上。将 20 μ l 菌液加入预冷的 1.5ml 管中，吹吸混和一次，盖上管盖，置于冰上。分装完毕之后，将暂时不用的感受态放入冰箱保存。

操作步骤

预先准备相应抗性的 LB 平板

1. 从冰箱中取出一定数量的感受态细胞(如有必要，包括一管测试质粒阳性对照)。将小管迅速置于冰上使之除了管盖都在冰中。如使用提供的标准包装细胞，将所需的一定数量的空聚丙烯微离心管置于冰上预冷。细胞在冰上融化 2-5 分钟。
2. 融解后轻弹管壁 1-2 次以重悬细胞。
3. **标准感受态细胞：** 吸取 20 μ l 感受态细胞加入预冷管中
Singles 感受态细胞： 根据是否做质粒阳性对照，进行 4 或 5
4. (可选做)在一管感受态细胞中加入 0.2ng(1 μ l)测试质粒，以确定转化效率。轻微摇动混和，随后将管重置于冰中。
5. 将 1 μ l 的连接产物或质粒 DNA 直接加入细胞中。轻微摇动混和随后将管重置于冰中，确保除了管盖其他部分都置于冰中。若有多个样品，重复此步骤。
6. 冰浴 5 分钟。
7. 42 水浴 30 秒；不可摇动。
8. 冰上放置 2 分钟。
9. **标准感受态细胞：** 每管加入 80 μ l 室温 SOC 培养基。
Singles 感受态细胞： 每管加入 250 μ l 室温 SOC 培养基。
全部加毕后，方可从冰上取出。 全部加毕后，方可从冰上取出。
10. 在含相应质粒抗性的平板上挑选转化子。当然也必须考虑特定宿主菌的抗性(见 14-15 页)。

当使用 NovaBlue 菌株时：如是氨苄抗性的话，无需复苏，尽管 30-60 分钟的复苏培养可能略微提高转化效率。将 5-50 μ l 的转化细胞直接涂平板。如果是卡那抗性的话，在涂布之前需要复苏 30 分钟，37 (250rpm)，再行涂板。

当用其他菌株时：在涂布之前需要预培养 60 分钟，37 (250rpm)。

提示：在摇床中复苏操作相当简便。将每个转化管放入 13mm \times 100mm 玻璃试管中置于架上。转化管的突出盖子可防止小管掉入试管底部，并保持垂直。

在复苏培养过程中(若省略复苏步骤，则更早)，将平板置于 37 培养箱中预热。如平板上有大量水汽，可将平板盖打开约 1/3，30-45 分钟。如不需除去水汽，将平板倒置 37 温育 20 分钟。

11. 将 5-50 μ l 的转化产物涂布于带有合适抗生素的 LB 平板上。如果涂布量小于 25 μ l，先吸取 SOC 培养基加到平板上，再吸取细胞加到 SOC 上。具体细节见下节“涂布技术”。



要点：涂布转化反应混和物的量取决于连接和感受态的效率。在高效率条件下(Novablue 感受态细胞转化效率大于 4×10^8 cfu/ μ g)，2 μ l 的混和物可以产生数百个转化子。重组子在 Novablue 中的转化效率取决于连接效率，一般可以达到 10^5 - 10^7 转化子/ μ g 质粒。

使用测试质粒时，将不多于 5 μ l (Novablue 细胞 10^8 的转化效率)或 10 μ l (10^6 转化效率)的转化反应混和物与 SOC 混和，涂布于羧苄青霉素或氨苄青霉素抗性平板上(测试质粒带有氨苄抗性基因)。

12. 将平板放于工作台上数分钟以使涂布的液体被吸收，倒置、37 培养过夜。

涂布技术

1. 从培养箱中取出平板。如果涂布混和液小于 25 μ l，我们建议先吸取 SOC 加到平板上，可以帮助菌落平均分布于平板表面。用无菌枪头将 40-60 μ l 的 SOC 滴在平板中央。
2. 轻弹转化管 5-8 次，打开管盖从转化反应液中部迅速取出转化混和物。
3. 将混和物加到 SOC 上。用枪头在 SOC 边缘来回抽吸几次(此操作可有效清洗枪头残留的转化混和物)。

ColiRollers™ 涂布珠

ColiRollers™ 涂布珠为玻璃珠，减少涂布棒使用和酒精燃烧消毒步骤，可均匀温和的涂布细胞，避免细胞损伤。

用 ColiRollers™ 涂布珠，每个平板有 10-20 珠。在转化液涂于平板之前/后，将珠子置于平板之上。盖上平板前后移动几次。珠子滚动的效应会使细胞平均分布。平板可以叠在一起同时摇动。操作完毕之后，倒置平板将珠子倒入收集盒中。盖上盖子进行培养(上述第 12 步)。

标准涂布棒

将涂布棒完全浸入酒精之中，燃烧灭菌。火灭之后，冷却 10 秒。涂布棒放在平板外周(不接触细胞)进一步冷却后，均匀涂布细菌。在平板上缓慢旋转涂布细胞。

要点：不要将涂布棒往下压 - 只需利用涂布棒本身重量产生的压力涂布细胞。

将样品均匀涂布于平板上。如果平板干燥，样品会迅速被吸收。水汽被吸收后，停止涂布。如果平板还是湿的话，继续涂布直至样品分布均匀。如果样品已被完全吸收，无需再涂布，因为涂布过度的话反而会降低转化率。涂布后，平板在室温下放置 15 分钟后再放入 37 培养箱。这样的操作确保水汽充分被吸收。

在 37 培养箱中，平板盖朝下培养 15-18h。略微延长培养时间(1-2h)可以得到更大的菌落，不过必须注意随着培养时间延长可能出现卫星菌落(37 培养超过 36 小时；当采用羧苄青霉素和卡那抗性时通常没有卫星菌落出现)。当菌落长到理想大小，将平板置于 4 保存。

C. pET 重组子分析

如果亚克隆成功的话，由连接反应产生的菌落数通常远大于阴性对照。然而有时即使两个平板中的菌落数大致相同，克隆也有可能成功。

有多种方法检验转化子，包括菌落 PCR、质粒抽提及酶切分析、测序，及体外转录和翻译。

在培养菌落进行质粒抽提之前，可以通过直接菌落 PCR 来检测插入片段和插入方向。这个步骤对于有一些杂带(非目标 PCR)也同时克隆入载体的情况很有帮助。为了检测插入方向和插入片段的大小，在两个独立反应中，采用 5pmol (1 μ l)的载体特异性引物及 5pmol (1 μ l)的插入片段 PCR 特有引物，进行 PCR 反应。对于几乎所有 pET 载体而言，T7 启动子引物(货号 69348-3)和 T7 终止



子引物分别适合作为 5' 和 3' 载体特异性引物。参考质粒图谱可以找到所有合适的引物。如果不需要判断插入方向，也可以在一个反应中只采用载体特异性引物。

要点：为了用 NovaTaq™ DNA 聚合酶在 pET CBD 载体中扩增完整 CBD.Tag™ 序列，将甘油加入 PCR 反应混和液中使终浓度达到 8 - 10%。当用 CBD_{cloS}.Tag, CBD_{cenA}.Tag 和 ASCBDcex 引物扩增 CBD 的一小部分的时候，无需加甘油。

用 EcoPro™ 系统分析转录/翻译水平

利用 EcoPro T7 偶联的转录翻译系统，可以通过目标蛋白的表达对 pET 重组子进行快速分析。较之其他原核体外表达系统，EcoPro 系统采用一种部分 *E.coli* 提取物使全长蛋白的产量大大提高。EcoPro 用于直接、高效的从超螺旋或线性 DNA 模板（包括 PCR 产物）合成蛋白质（McCormick and Ambuel, 2000）。可以用连接反应产物或菌落作为模板制备 PCR 产物。当目标片段是 PCR 产物被克隆时，菌落筛选相当有用，因为可以快速检测出个别克隆中由 PCR 产生的预期外终止密码子。合成的蛋白可以通过 ³⁵S-Met 标记来检测，也可以用标签特异性或目标蛋白特定的抗体进行 Western 杂交，或利用 FRETWorks™ S•Tag™ 或 S•Tag 快速分析试剂盒进行定量分析。

质粒模板

EcoPro™ T7 系统中使用的 DNA 模板必须完全去除 RNA 酶，Mg²⁺ 和盐。采用 Mobius™ 或 UltraMobius™ 质粒纯化试剂盒纯化的质粒已经完全去除 RNase，无需进一步纯化即可直接用在转录/翻译反应中。按照其他使用 RNase A 纯化质粒的方法制备质粒 DNA 时，必须进行酚抽提和沉淀。加入 TE 至 100μl，并用 TE 缓冲液：CIAA 液（1：1，其中 CIAA 是 24 份氯仿加上 1 份异戊醇）抽提两次，再用 CIAA 抽提一次。将水相转入干净的试管加入 0.1 倍体积的醋酸钠和两倍体积的乙醇。混和后 - 20 放置 30 分钟，12000g 离心 5 分钟，去除上清，70% 的乙醇洗沉淀。干燥后用 30μl TE 重溶 DNA。如果需要，可以在抽提之前在 TE 缓冲液中加入 2μl Pellet Paint 或 Pellet Paint NF 以提高 DNA 回收率（使用 Pellet Paint 可省去 - 20 孵育步骤）。

注意：与 Novagen 的 Mobius 和 UltraMobius 质粒纯化试剂盒不同的是，有些试剂盒中在纯化过程中并没有除去 RNase；因此在使用此类试剂盒时，最后再用酚抽提是最安全的方法。

如果采用线性质粒作为模板，我们建议使用最后产生平末端或 5' 突出端的限制性内切酶。带有 3' 突出端的模板可能导致 T7 RNA 聚合酶从无义链引发异常转录（Schenborn and Mierendorf 1985）。反义 RNA 会和原本的转录产物一起退火，进而抑制了 EcoPro 反应中翻译的进行。如果一定要采用产生 3' 突出端的限制性内切酶，可以在酶切之后加入 25uM dNTPs (5 min, 25 °C, 1U/μg DNA) 用 Klenow 片段处理。一般产生 3' 突出端的限制性内切酶包括 *PstI*, *KpnI*, *SacI*, *SacII*, *BstXI*, *NsiI*, *ApaI*, *AatI*。

PCR 模板

为了制备合适的 PCR 产物进行转录或翻译，选用可以在插入片段的正确方向扩增 T7 启动子的引物（见下表）。T7 启动子引物并不适合此项操作，因为如果启动子位于基因最开头的话，T7 聚合酶的转录效率会大大降低；为此可以采用 pET 上游引物，它几乎适合所有的 pET 载体。如果只有一个酶切位点的连接（不定向），那么采用插入片段特定 3' 引物可以扩增出正确方向的插入片段。如果不必考虑方向性，T7 终止子引物也是合适的。

体外转录/翻译的引物

载体	5' 引物	3' 引物 ²
pET 系列 ¹	pET 上游引物	T7 终止子引物
pET LIC 载体	pET 上游引物	T7 终止子引物

¹ 除了 pET-17b, 20b(+), 23(+) 和 23a-d(+); 用质粒 DNA 为模板

² 载体 3' 引物可扩增两个插入方向的片段

pET System Manual 目的片段克隆



要点：用 NovaTaq™ DNA 聚合酶及 pET 上游引物扩增 CBD.Tag™ 重组子时，PCR 反应混和液中必须加入终浓度为 8 - 10% 的甘油。



转录/翻译分析的连接 PCR

在进行 EcoPro™ T7 转录或翻译之前，可以用 PCR 方法分析连接反应。该步骤并不能检测单一克隆，而用菌落 PCR 的方法可以。

1. 连接 PCR 反应体系：

1 μl	连接反应液 1:10 稀释于 TE 缓冲液中 (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) (0.25–0.5 ng 载体)
5 μl	10X NovaTaq™ 缓冲液 含 MgCl ₂
1 μl	pET 上游引物 (5 pmol)
1 μl	下游引物 (5 pmol)
1 μl	10 mM dNTP 混和物
0.25 μl	(1.25 U) NovaTaq DNA 聚合酶
x μl	加无菌水体积至总体积
50 μl	总体积

要点： 为获得最大特异性、以及长模板的更高产量，可以分别选用 KOD 热启动聚合酶和 KOD XL DNA 聚合酶，配合相应的缓冲液和循环条件（参见操作手册 TB320）。

2. 最后加入酶或 DNA 启动反应，轻柔混和，用 200 μl 枪头加入两滴矿物油防止挥发。若要达到最佳效果可以在加入酶或 DNA 之前将反应液加热至 80 。

3. 将管置入 PCR 仪中，按下列方案作 30 个循环。

- 94 1 分钟
- 退火温度（载体引物通常为 55 ）1 分钟
- 72 2 分钟
- 最后一次延伸 72 6 分钟

4. 为了去除上层矿物油并使聚合酶失活，加入 100 μl 氯仿，混和 30 秒，离心 1 分钟。DNA 包含在顶层水相（可能模糊）。如果需要，取出 5 - 10 μl 进行电泳分析（详见 29 页的菌落筛选）。可在胶上见到一相应大小的亮带。

5. 在进行 EcoPro™ T7 反应之前，沉淀 PCR 产物以去除盐分。在 50 μl 的 PCR 反应液中加入 5.2 μl 的 3M 醋酸钠和 115 μl 的 95% 乙醇。加入 2 μl 不影响 EcoPro T7 反应的 Pellet Paint (货号 69049-3) 或 Pellet Paint NF (货号 70748-3)，使沉淀可见。略微振荡，14000g 离心 5 分钟。用 70% 乙醇洗沉淀后，再用 100% 乙醇洗。干燥沉淀以去除残余乙醇，重新溶于 10 - 20 μl 的双蒸水中。取 2 - 4 μl 进行 EcoPro T7 反应。



转录/翻译分析的菌落 PCR

1. 用 200 μ l 的枪头或无菌牙签从平板上挑取菌落。选取直径大于 1mm 的菌落，获得尽可能多的细胞。如果要保留菌落的拷贝，转移之前枪头轻触平板。
2. 将细菌转移至装有 50 μ l 无菌水的 0.5ml 管中。振荡使细胞分散。
3. 将管置于沸水或 99 加热 5 分钟使细胞裂解、DNase 变性。
4. 12000g 离心 1 分钟以去除细胞残片。
5. 取 10 μ l 上清液加入 0.5ml 空管中以备 PCR。用之前置于冰上。
6. 菌落 PCR 反应体系

31.75 μ l	无菌水
1 μ l	dNTP 混和物 (10 mM each dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
1 μ l	pET 上游引物, 5 pmol/ μ l
1 μ l	下游引物, 5 pmol/ μ l
5 μ l	10X NovaTaq™ 缓冲液 MgCl ₂ ,
0.25 μ l	(1.25 U) NovaTaq DNA 聚合酶
40 μ l	总体积

考虑到吸取液体的损失，可乘以 X 5 倍，X 代表反应次数。

注意：为了获得长而复杂目的片段的最大产量和专一性，可以分别选用 KOD XL DNA 和 KOD 热启动 DNA 聚合酶，配合相应的缓冲液和循环条件（参见 TB320）。KOD 聚合酶在日本没有供应。

7. 每个样品中加入 40 μ l PCR 反应混和物，轻柔混和，加入两滴矿物油，将样品放入 PCR 仪。

注意：在加入 PCR 反应混和物之前可将裂解的样品预热至 80 ，以进行热启动

8. 将管置入 PCR 仪中，按下列方案作 30 个循环。

- 94 1 分钟
- 退火温度（载体引物一般为 55 ）1 分钟
- 72 2 分钟
- 最后延伸 72 6 分钟

9. 为了去除上层矿物油并使聚合酶失活，加入 100 μ l 氯仿，混和 30 秒，离心 1 分钟。DNA 包含在顶层水相（可能模糊）。如果需要，取出 5 - 10 μ l 进行电泳分析（详见 29 页的菌落筛选）。可在胶上见到一相应大小的亮带。

10. 在进行 EcoPro T7 反应之前，沉淀 PCR 产物以去除盐。在 50 μ l 的 PCR 反应液中加入 5.2 μ l 的 3M 醋酸钠和 115 μ l 95%乙醇。加入 2 μ l 不影响 EcoPro T7 反应的 Pellet Paint (货号 69049-3)或 Pellet Paint NF (货号 70748-3)，使沉淀可见。略微振荡，14000g 离心 5 分钟。用 70%乙醇洗沉淀后，再用 100%乙醇洗。干燥沉淀以去除残余乙醇，重新溶于 10 - 20 μ l 的双蒸水中。取 2 - 4 μ l 进行 EcoPro T7 反应。

**菌落筛选**

利用上节所述 Novagen 的载体特定引物直接进行菌落 PCR，无需抽提质粒就可以检测插入片段。对大多数 pET 载体而言，T7 启动子引物和 T7 终止子引物是进行菌落 PCR 的合适引物。pET-17xb，pSCREEN-1b(+) 和 pEXlox(+) 载体是例外，在这些载体中可用 T7 基因 10 引物取代 T7 启动子引物，在 pET-43.1a-c(+) 和 pET-44.1a-c(+) 中用 Nus•Tag 引物代替 T7 启动子引物。

分析反应产物 (从上述菌落 PCR 的第 9 步开始)

1. 去除上层矿物油，加入 100 μ l 氯仿。
2. 在顶层水相中加入 5 μ l 10 \times 上样染料
3. 在含有 0.5 μ g/ml 溴化乙锭的 1% 琼脂糖胶中，每孔上样 10 - 25 μ l，并加 Perfect DNA Marker。

制备质粒的操作步骤

筛选出阳性克隆后，抽提中等拷贝的 pET 质粒 DNA，以备转化表达宿主菌，酶切分析和测序。重组子也可进行体外转录/翻译分析。用作体外转录/翻译时，去除模板中的 RNase 相当重要。用 Mobius™ 或 μ ltraMobius™ 试剂盒纯化的质粒 DNA 完全不含 RNase。然而用 SpinPrep™ 质粒纯化试剂盒或其他试剂盒纯化质粒时需要酚：CIAA 抽提以去除 RNase，详见 25 页。

起源于 pBR322 的中等拷贝质粒在每个细胞中会产生 20 - 60 个拷贝。起源于 pUC 的高拷贝质粒在每个细胞中会产生大于 200 个拷贝。

质粒纯化试剂盒	范围	DNA 产量	货号	规格
Mobius 1000 Plasmid Kit	100 ml (高拷贝)	> 1 mg (高拷贝)	70854-3	2 rxn*
	250 ml-1.5 liter (中等拷贝)	200 μ g-1 mg (中等拷贝)	70853-3	10 rxn*
			70853-4	25 rxn*
UltraMobius 1000 Plasmid Kit	100 ml (高拷贝)	> 1 mg (高拷贝)	70907-3	2 rxn*
	250 ml-1.5 liter (中等拷贝)	200 μ g-1 mg (中等拷贝)	70906-3	10 rxn*
			70906-4	25 rxn*
Mobius 500 pET Plasmid Kit	500 ml 培养液	500 μ g (低拷贝)	70969-3	10 rxn
Mobius 200 Plasmid Kit	35 ml 培养液 (高拷贝或中等拷贝)	> 200 μ g (高拷贝)	70970-3	25 rxn
		> 30 μ g (中等拷贝)		
UltraMobius 200 Plasmid Kit	35 ml 培养液 (高拷贝或中等拷贝)	> 200 μ g (高拷贝)	71090-3	25 rxn
		> 30 μ g (中等拷贝)		
SpinPrep Plasmid Kit	1-3 ml 培养液	5-10 μ g (高拷贝)	70957-3	20 rxn
		0.25-1 μ g (中等拷贝)	70851-3	100 rxn

*试剂盒包装为 100ml (高拷贝) 或 250ml (中拷贝) 制备。大于 250ml (中拷贝) 规模的制备则需要外加缓冲液 (请参考操作手册 TB279)。

测序

若测序模板需要沉淀，加入 Pellet Paint® 或 Pellet Paint NF Co-Precipitant 有利于看到沉淀。Pellet Paint NF (货号 70748-3) 结合基于 rhodamine 的标记方法 (例如 PE Applied Biosystems automated sequencers)，Pellet Paint (货号 69049-3) 配合基于 Cy5 的自动测序仪使用。

在各种测序试剂盒中都会有详尽的针对双链和单链模板的测序步骤。在 www.novagen.com 网站上也可以找到针对 pET 载体的测序引物。

可用 Strandase™ 试剂盒 (货号 69202-3) 将 PCR 产物转变成单链 DNA 模板，或是用单链辅助噬菌体感染带有 f1 复制子的质粒。pET 载体中 f1 复制子是有方向性的，这使得产生的单链 DNA 与 T7 终止子引物退火。一些厂商也提供辅助噬菌体 (R408 或 M13KO7) 以及感染和分离 DNA 的操作手册。Novablue 宿主菌带有 F' 因子，因此适合辅助噬菌体感染。



IV. 表达目的基因

A. 转化表达菌株

为了转化入表达用宿主菌株（如 DE3 溶原菌），先要准备合适的感受态细胞，选用经无菌水或 TE 缓冲液稀释 50 倍的质粒 1 μ l（约 1ng），按第 23 页的转化步骤进行操作。单个克隆划线转化和甘油保存参见 19 页。

B. DE3 溶原菌的诱导

若目标质粒已存在于 DE3 溶原菌中，在生长培养基中加入 IPTG 即可诱导目的 DNA 的表达。对于带普通 T7 启动子的 pET 重组子，终浓度为 0.4mM 的 IPTG 可以实现完全诱导，而带有 T7lac 启动子的载体则需要终浓度为 1mM 的 IPTG 才能完全诱导。诱导的具体操作见下文。小规模培养的诱导、分级和表达分析将在第 34 页第 VI 章目的蛋白分析中提及。

在一些 DE3 宿主菌中通过调节 IPTG 的浓度可以改变蛋白表达的水平。RosettaTM(DE3)，TunerTM(DE3) 和 OrigamiTMB (DE3) 菌株都包含了 *lacY1* 突变，它们都消除了乳糖通过 *lac* 透性酶进入细胞的主动运输。因此这些菌株对于培养基中的乳糖不敏感，IPTG 对所有细胞的诱导更为均衡。当采用这些菌株时，IPTG 的浓度应在 25 μ M-1mM 之间选择，确定最佳 IPTG 浓度使目的蛋白达到最佳的活性和溶解性。

避免过夜培养以防止本底表达升高，以及培养基中的抗生素损耗。如果需要过夜培养，可加入 0.5-1% 的葡萄糖以降低目的蛋白在诱导之前的表达。

诱导的准备工作

从新鲜的划线平板中挑取单克隆，接入 50ml 含有合适抗生素的 LB 中，选用 250ml 摇瓶（Erlenmeyer flask）。为获得良好的通气，培养基最多只能是摇瓶体积的 20%。

另一种方法就是将单克隆或甘油菌接入 2ml 含有适当抗生素的 LB 培养基中。37 $^{\circ}$ C 震荡培养至 OD₆₀₀ 值达到 0.6-1.0。4 $^{\circ}$ C 保存过夜。次日早上离心收集细胞。将细胞重悬于 2ml 含适当抗生素的新鲜培养基中，以此接种入 50ml 培养基。

诱导的操作步骤

1. 37 $^{\circ}$ C 摇床培养至 OD₆₀₀ 到 0.4-1 (建议 OD₆₀₀ 为 0.6，大约 3 小时后可达到)。
2. (可选做) 从中取出一些样品作为未诱导对照及按照 38 页所述质粒稳定性测试实验进行滴度测试 (T7lac 启动子质粒不建议用该步骤)。在剩下的样品中加入 100mM IPTG 储液至终浓度 0.4mM (T7 启动子) 或 1mM (T7lac 启动子)，继续培养 2-3 小时。
3. 将摇瓶置于冰上 5 分钟，5000g 离心 5 分钟收集菌体。如果需要，收集上清液进行进一步分析 (详见第 VI 章)。
4. 重悬细胞于 0.25 倍体积预冷的 20mM Tris-HCl (pH8.0) 中，离心。
5. 除去上清，菌体保存于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱或继续纯化 (随着冰箱保存的时间增加，包涵体的可溶性会降低)。

注意： 带有 pLysS 或 pLysE 的细胞冻融时会发生裂解。



V. 优化表达条件

下列步骤和建议将使目标蛋白的表达达到最优化。其中包括质粒稳定性，蛋白溶解性以及其它一些影响目的基因表达的因素。

A. 增加蛋白溶解性及折叠

在 *E. coli* 中表达的重组蛋白经常以聚集的形式表达，被称作包涵体。即使在形成包涵体时，还是有一部分目的蛋白是溶解的。由于 pET 系统的高表达水平，即使有大量的目的蛋白聚集形成包涵体，也会有相当多的可溶性目的蛋白存在。在通常情况下，降低蛋白合成速率，如降低诱导培养温度及在基本培养基中生长都会使目的蛋白的可溶性增加。

在许多应用中需要目的蛋白以可溶及活性形式存在。下列建议将有助于增加目的蛋白的可溶性。需要注意的是蛋白可溶并不意味着蛋白正确折叠，一些可溶的蛋白并无活性。载体、宿主菌、蛋白序列和培养条件都会降低或升高蛋白可溶/不溶形式的比例。

温度

37 °C 生长常常会使一些蛋白累积形成包涵体，而 30 °C 生长则可能产生可溶的和有活性的蛋白 (Schein and Noteborn, 1989)。如果你打算利用一些 pET 载体中的信号肽序列输出蛋白的话，在 25 °C 或 30 °C 生长和培养可能是最优化的。在某些情况下，低温 (15-20 °C) 延长诱导时间 (过夜) 可以使溶解性蛋白的产量达到最大。

裂解缓冲液

裂解缓冲液的性质会大大影响到目的蛋白可溶与不溶形式之间的比例。当采用一般的裂解缓冲液如 1 × His Bind Binding 缓冲液 (包括 500mM NaCl) 时，一些包含疏水或膜相关结构域的蛋白可能被归于不溶部分，但并不出现在包涵体中。在裂解缓冲液中加入毫摩尔的非离子型或两性去污剂可以将由于与细菌脂或膜结合而不溶的蛋白组分转变成可溶组分。BugBuster 蛋白抽提试剂或 PopCulture 试剂与 rLysozyme™ 溶剂一起使用，是使蛋白溶解的理想选择。非离子型和两性去污剂能够溶解细胞壁和膜组分，因此无需变性就可以释放出胞内蛋白。BugBuster 和 PopCulture 中的去污剂可以使一些膜结合蛋白或疏水蛋白溶解。其他一些去污剂也可能用来溶解这些膜蛋白，但有可能其中一些不能溶解。选择合适的去污剂来溶解蛋白仍是一件需要实验摸索的事。如何在细菌裂解中选用去污剂，见 ‘实验 2：大鼠肝胰胰岛素受体的溶解与纯化’ (Brennan and Lin, 1996)。注意，加入去污剂可能会对下游的纯化操作带来影响。

包含高电荷结构域的目的蛋白可能与其他一些细胞元件关联 (如可能与 DNA 结合)。在这种情况下目标蛋白可能与细胞残余在一起，理论上可以在裂解缓冲液中加入盐或用 Benzonase 核酸酶消化核酸 (见操作手册 TB261) 来解决这类问题。



细胞周质定位

另一个得到活性可溶蛋白的策略就是采用可以将蛋白运输到细胞周质的载体。在周质中更有利于蛋白折叠及二硫键的形成 (Rietsch et. Al.1996; Raina and Missiakas, 1997; Sone et al., 1997)。为了达到此目的, 选用带有信号肽的载体, 如 pET-12, 20, 22, 25, 26, 27, 36, 37, 38, 39, 40。带有 CBD_{cenA} 信号序列的目的蛋白被运输到周质中, 并可能渗漏到培养基中, 从而使纯化操作简化 (Novy et al., 1997)。然而一些目的蛋白并不适合被运输到周质中。例如一些与 -gal 融合的周质蛋白被证明是有毒的 (Snyder and Silhavy, 1995)。另外一些成熟蛋白 N 端氨基酸的净电荷可能抑制转运过程 (Kajava et al., 2000)。

一些 pET 载体包含信号序列与目的蛋白融合, 如 pET-39b(+)和 pET-40b(+)所设计的融合序列分别表达在周质中催化形成二硫键的(DsbA)酶和使二硫键异构化的 (DsbC) 酶 (Missiakas et al., 1994; Zapun et al., 1995)。如果融合蛋白可以被运输到周质中, 直接与酶相偶联可以增加蛋白的可溶性及促进二硫键的形成。在与 DsbA 融合之后, 蛋白生成二硫键并正确折叠产生活性 (Collins-Racie et al., 1995)。注意, 过表达的 DsbC 酶是以氧化形式存在, 它必须暴露于还原试剂中 (0.1-1.0mM DTT) 在体外才表现出二硫键异构酶的活性 (Joly and Swartz, 1997)。pET-40b(+)表达的融合蛋白一般先经 His•Bind 或 Ni-NTA His•Bind 纯化。在融合蛋白接触还原剂之前, 加入终浓度为 1mM 的 EDTA, 或将样品透析以去除残余 Ni²⁺。如使用 Ni-NTA His•Bind 树脂进行纯化, EDTA 和透析都不必进行。

细胞质定位

Trx•TagTM、GST•TagTM和 Nus•TagTM融合标签都是高度可溶的多肽, 可以增加目的蛋白的溶解性。如果选用的载体在胞质中表达蛋白, 采用在胞质中可以生成二硫键的 *E.coli* 宿主菌将有助于折叠 (见 宿主菌部分)。在载体中都设计了位点专一性蛋白酶识别位点, 使融合标签可以被完全去除 (见第 9 页)。

血吸虫谷胱甘肽 - S - 转移酶 (GST) 通常在 *E.coli* 蛋白表达中被用作 N-端融合伴侣。尽管并非为此目的而特殊设计, GST•Tag 序列也可以增加融合蛋白的可溶性。pET-41a-c(+)和 pET-42a-c(+)载体编码 GST•Tag 序列, 可以分别被凝血酶、胰蛋白酶和 Xa 因子切割。注意, 这些载体都是卡那抗性因此不适用 *trxB* 突变宿主菌。

原来在 *E.coli* 中以不溶形式存在的蛋白当与 N-端硫氧还蛋白(Trx•Tag)序列融合后, 往往可增加溶解性 (LaVallie et al., 1993; Novy et al., 1995)。pET-32a-c(+)中的 Trx•Tag 不仅可以增强一些蛋白的可溶性, 也可以在 *trxB* 突变菌的胞质中催化二硫键的形成 (Stewart, 1998)。pET-32a-c(+)与 *trxB/gor* 突变菌 OrigamiTM, Origami B 和 Rosetta-gamiTM 相匹配, 而这些菌株都可以在胞质中促进二硫键的形成, 因此这样的组合可以获得最大产量的可溶、有活性及正确折叠的目的蛋白。

pET-43.1a-c(+)和 pET-44a-c(+)载体整合了一个促溶解多肽 Nus•Tag 序列, 这是经 *E.coli* 蛋白表达系统研究开发、在过表达时具有最高可溶性的多肽 (Davis et al., 1999; Harrison, 2000)。测试中 4 种不同的 NusA 融合蛋白可溶性都超过了 85% (Harrison, 2000)。pET-43.1a-c(+)和 pET-44a-c(+)载体也与 *trxB/gor* 突变菌 OrigamiTM, Origami B 和 Rosetta-gamiTM 相匹配, 而这些菌株都可以在胞质中促进二硫键的形成。



宿主菌

许多蛋白需要形成二硫键才得以正确折叠并产生活性；然而，*E. coli* 的胞质并不是一个促进二硫键形成的有利环境。采用 OrigamiTM、Origami B、Rosetta-gamiTM、AD494 或 BL21*trxB* 宿主菌可以促进这些菌株胞质中二硫键的形成，进而影响目的蛋白的可溶性及活性。AD494 和 BL21*trxB* 菌株是硫氧还蛋白还原酶(*trxB*)突变体。OrigamiTM、Origami B、Rosetta-gamiTM 菌株不仅是硫氧还蛋白还原酶(*trxB*)突变体，还是谷胱甘肽还原酶(*gor*)突变体，这进一步增强了二硫键的形成。如果目的蛋白中既含有二硫键，其目的基因还同时包含稀有密码子，Rosetta-gamiTM 菌株是最佳的选择（见下文，补充稀有密码子）。如果目的蛋白中含有一个或更多的关键二硫键，pET-32a-c(+)载体与 *trxB* 或 *trxB/gor* 宿主菌的组合被证明是最佳的选择，因为在胞质中二硫键的形成取决于硫氧还蛋白的存在（Stewart, 1998）。当然也可以参考 12 页二硫键形成及增加可溶性相关章节。

TunerTM及其衍生菌株（OrigamiTM B 和 RosettaTM）是 BL21 菌株的 *lacYI* 缺失突变体，可以在培养过程中调节所有细胞蛋白表达的水平。通过调节 IPTG 的浓度，表达可以从很低水平调节至最高水平，直至 pET 载体完全诱导的水平。低水平表达可能增加一些困难目的蛋白的可溶性和活性。

B. 稀有密码子

多数氨基酸都有一个以上的密码子，对 *E. coli* 密码子应用情况的分析表明一些密码子很少使用。尤其是 Arg 密码子 AGA, AGG, CGG, CGA, Ile 密码子 AUA, Leu 密码子 CUA, Gly 密码子 GGA 和 Pro 密码子 CCC 很少被用到。当异源目的基因的 mRNA 在 *E. coli* 中过表达时，tRNA 的数量直接反映了 mRNA 的密码子偏倚性。由于一个或多个 tRNA 的稀有或缺少可能导致翻译的停止。不充足的 tRNA 库可能导致翻译延迟、成熟前翻译终止、翻译移码和氨基酸错配。

尽管少量稀有密码子的出现通常不会给目的蛋白的合成造成太大影响，不过如果一个基因中含有成串或多个 *E. coli* 稀有密码子，外源蛋白的表达将非常低。目的基因中含过多的稀有密码子被认为是低表达水平和产生不完全产物的一个原因（Sorensen et al., 1989; Zhang et al., 1991）。当在氨基端附近出现多个稀有密码子时，情况更为严重（Chen and Inouye, 1990）。许多研究表明 Arg 密码子 AGA 和 AGG 的高频出现可能大大影响蛋白产量。当这些密码子连续出现在 N-端附近，这种影响将达到最大（Brinkmann et al., 1989; Hua et al., 1994; Schenk et al., 1995; Calderone et al., 1996; Zahn, 1996）。多个实验室报道，当在宿主菌中增加同类 tRNA 时那些含有稀有密码子基因的蛋白产量将大大提高（Brinkmann et al., 1989; Seidel et al., 1992; Rosenberg et al., 1993）。例如在一个带有额外拷贝的 AGG 和 AGA tRNA 的菌株中人类血浆酶原的产量增加了将近 10 倍（Brinkmann et al., 1989）。增加其他 AUA, CUA, CCC 或 GGA 的 tRNA 也可以增加外源蛋白的产量和忠实性。

RosettaTM 菌株被用来增加含有稀有 Arg 密码子 AGG 和 AGA, Ile 密码子 AUA, Leu 密码子 CUA, Pro 密码子 CCC 和 Gly 密码子 GGA 目的蛋白的表达。tRNA 由一个与 pET 载体相容的氯霉素抗性质粒(以 pACYC 为骨架)带有的自身启动子所表达。含有 pLysS 的 Rosetta 菌株在带有 T7 溶菌酶相同骨架上带有编码稀有密码子的基因。Rosetta 菌株是 *lon* 和 *ompT* 蛋白酶缺陷型的一个 B-衍生菌。RosettaBlueTM 和 Rosetta-gamiTM 菌株分别衍生于 K-12 NovaBlue 菌株和 Origami 菌株。RosettaBlue 还具有高转化效率，以及由高水平 *lac* 阻遏子(*lacI^s*)所带来的严谨性控制。Rosetta-gamiTM 菌株是 *trxB/gor* 突变株，通过形成二硫键促进蛋白折叠（见 12 页，二硫键形成及可溶性增强）。Rosetta 菌株相当适合用于表达那些含有 *E. coli* 稀有密码子基因的目的蛋白（Novy et al., 2001）。

C. 毒性基因及质粒稳定性

pBR322 质粒及其衍生型（包括 pET 载体）在宿主菌中相当稳定，即使在有抗生素压力的情况下培养数代，大部分宿主菌中仍保有这些质粒。如果克隆入质粒的外源基因产物对宿主菌具有毒性，就会遇到质粒不稳定的问题。pETcocoTM 系统通过降低 pETcoco 的拷贝数直至每个细胞中仅一个拷贝来降低基础表达水平（Sektas and Szybalski, 2002）。毒性极大的基因产物也可以在该系统中稳定存在并表达（见操作手册 TB333）。



在 pET 系统中，可在菌株生长已受损害的情况下维持质粒的存在和一定表达水平；缺乏质粒的细胞可能由于质粒拷贝数的降低或其他原因，其数量有所增加。在这种情况下，若没有选择压力，不含质粒的细胞将很快生长。如果要使大部分细胞都含有质粒，培养基中一定不能没有抗生素。下面几节将对如何维持质粒稳定加以描述。

氨苄青霉素的使用

氨苄青霉素作为一种选择性抗生素的应用需要相当小心，因为 β -内酰胺酶的表达可以达到相当数量，并分泌到培养基中破坏所有的氨苄青霉素。另外由细菌代谢所造成的酸性环境也容易使氨苄青霉素水解。带有不稳定质粒的菌株在有氨苄青霉素选择压力的情况下生长，一旦足够的 β -内酰胺酶分泌破坏了氨苄青霉素之后，缺乏质粒的细胞将不再被杀死，并开始快速生长。对于 pBR322 衍生质粒，一般采用 50 μ g/ml 氨苄浓度，当培养基变混浊时（ 10^7 细胞/ml）也就意味着氨苄的失效。200 μ g/ml 的氨苄浓度会使达到氨苄失效点的细胞浓度略有提高，但由于 β -内酰胺酶的催化活性，即使加再多的氨苄也很难使细胞生长达到饱和时仍维持选择压力。

另一个复杂因素就是在生长达到饱和时毒性基因会杀死细胞，而在细菌指数生长期很少有此类情况发生。在达到饱和期时几乎所有的细胞都含有质粒，但随着继续培养，带有质粒的细胞变得越来越少，而缺乏氨苄选择压力使不含质粒的细胞过生长。

在选择压力下生长的宿主菌生长达到饱和时，会有相当数量的 β -内酰胺酶分泌到培养基中，此时缺乏质粒的细胞已开始过生长。用新鲜的含氨苄培养基将之稀释 200 到 1000 倍再培养是一种常用的解决办法。然而，饱和菌液中存在足够多的 β -内酰胺酶，即使经过稀释它们也足以在不包含质粒的细胞死亡之前使氨苄失效。因此这样的做法会使菌株在完全没有选择压力的情况下生长。接种菌中已含有相当一部分没有质粒的细胞，随着亚培养时间的延长，菌体达到可以诱导目的蛋白表达的浓度时，含有质粒的细胞可能仅占菌液中的很小一部分。若未能意识到这些潜在的问题，很有可能得到错误的结论：目的基因表达水平很低。然而事实上菌液中仅有一小部分是含测试质粒的细胞。

在分离、保存和表达目的质粒的步骤中随时作好防范措施可以最大程度的保留质粒。Novagen 实验显示用羧苄青霉素代替氨苄青霉素可以防止不含质粒细胞的迅速生长，部分原因是羧苄青霉素在低 pH 具有更高的稳定性。选用含有卡那抗性基因的 pET 载体是另一种选择。避免 amp^R 抗性菌生长到饱和状态（过夜；16h）也可以维持最大的选择压力。在 16 页抗生素抗性一节中， Kan^R 与 amp^R 相比的优势有详尽的讨论。

补充葡萄糖

带有毒性基因的质粒在 DE3 溶原菌中过夜培养时可能不稳定，这是由于 cAMP 对于 T7 RNA 聚合酶的刺激作用（Grossman et al., 1998）。通过避免过夜培养或在培养液中加入 0.5-1% 葡萄糖可以有效避免或延缓质粒丢失情况。详见 11 页。

测试质粒的稳定性

质粒稳定性测试可以用来判断含有目的质粒细胞的比例，以及表达蛋白的能力。这一方法只适于带有普通 T7 启动子的 pET 质粒和缺乏 pLysS 和 pLysE 的宿主菌。该方法对于带有 T7lac 启动子、pLysS 和 pLysE 的质粒并不可靠，这是由于包含质粒和无害目的蛋白的菌落在加入 IPTG 后仍可生长。IPTG 并不能阻止带有 T7lac 启动子的载体和 pET-3 形成菌落。在 pLysE 存在的情况下，IPTG 通常不能阻止菌落形成，除非目的基因产物是有毒性的。

缺乏选择性压力（尤其是 amp^R ）加上目的蛋白的毒性可能导致在培养基中目的蛋白停止表达。由于存在质粒丢失的可能，在诱导前通过涂布来判断培养液中细胞的组成情况。这个简单的操作对于解释后继诱导可能产生的不正常现象相当有用，也可确保精力不会浪费在处理那些不适合表达的细胞上。如果对质粒不稳定性的可能有足够重视，培养液中 98% 的细胞通常都是带有目的质粒的。通常在诱导后 2 - 3 小时收集细胞，此时目的蛋白累积足够长时间，且在质粒已丢失的细胞过生长之前。某些目的蛋白累积增加会持续更长的时间。

我们建议在诱导之前，在下列四种平板上测试培养液，以判断细胞中携带目的质粒的细胞组成。



平板号#	铺板指示	对应结果
1	10 ⁻⁶ 稀释在琼脂板	所有细胞生长
2	10 ⁻⁶ 稀释在含抗生素平板	只有携带质粒的细胞能生长
3	10 ⁻⁵ 稀释在含 1 mM IPTG 平板	只有质粒已丢失或无法表达目的基因的细胞能生长*
4	10 ⁻⁵ 稀释在含 1 mM IPTG 和 抗生素平板	只有仍携带质粒但已失去表达目的基因能力的细胞能生长*

* 3、4 不适用：采用 T7lac 启动子或 pLysS、pLysE 质粒，pET-3a-c。

在一般用于目的蛋白表达的培养基中，几乎所有细胞都可以在不加添加剂及只含抗生素的平板上形成菌落；少于 2% 的细胞会在仅含有 IPTG 的平板上形成菌落；少于 0.01% 的细胞会在含有抗生素和 IPTG 的平板上形成菌落。抗生素将阻止任何不带有目的质粒的细胞形成菌落。IPTG 将阻止任何带有 T7 RNA 聚合酶诱导基因和功能目的质粒的细胞形成菌落。对于携带不稳定目的基因质粒的细胞，质粒丢失的细胞比例可以通过在 IPTG 平板上菌落数的增加和在抗生素平板上菌落数的下降来反映。在某些情况下会遇到所携带质粒发生突变而不能表达目的 DNA 的情况，但这样的情况很少。

如果质粒稳定，使用来自冰箱冻存管的菌株进行目的基因表达无需采取特别防范；即使抗生素在新鲜培养基中已失效，或过夜培养至饱和状态，几乎所有的细胞都会携带目的质粒。然而如果目的质粒不稳定，目的蛋白将很少表达甚至不表达。在这种情况下，来自 8% 甘油冻存的菌液要进行 10⁴ 或更高倍数稀释培养（详见下章）并生长到适于表达的浓度。

稳定甘油菌株保存过程中氨苄抗性 pET 载体上的毒性基因的措施

下列步骤通常用来使甘油菌株保存中含有氨苄抗性的目的质粒的细胞比例最大化。

氨苄抗性菌株的保存：

1. 从转化平板中接种一单克隆，加入 2ml 含 50μg/ml 羧苄青霉素的 LB 培养基中，培养数小时至菌液略呈混浊。
2. 在含有羧苄青霉素的平板上划线培养以获得单克隆。
3. 待菌落长大（通常 37 过夜），接种入 2ml 含 50μg/ml 的羧苄青霉素 LB 培养基中，培养至 OD₆₀₀ 为 0.5。

技巧：若目的基因具高度毒性，在含有 0.5-1% 葡萄糖的 LB 琼脂平板上划线可以降低基础表达水平。

4. 将 0.9ml 的菌液与 0.1ml 80% 甘油混和，存于 -70 冰箱中。如果对质粒稳定性有疑问，可进行质粒稳定性测试（34 页）以确定含有质粒细胞的比例。

稳定诱导过程中氨苄抗性 pET 载体上的毒性基因的措施

下列诱导步骤经 Novagen 测试，对于一个克隆在 pET-22b(+) 中的极端毒性基因相当成功。包括采用高浓度的羧苄青霉素及在诱导之前两次更换培养基。

毒性基因的诱导：

1. 将一个单菌落接入 2ml 含 200μg/ml 羧苄青霉素 TB 培养基中，37 培养至 OD₆₀₀ 为 0.2-0.6。
2. 离心收集细胞（30 秒，微离心管），除去上清液，重悬于 2ml 新鲜培养基中。取 100μl 样品加入 8ml 含 500μg/ml 羧苄青霉素培养液中，37 培养至 OD₆₀₀ 为 0.2-0.6。

注意：去除旧培养液是为了除去分泌出的 β-内酰胺酶。

3. 1000g 离心 5 分钟收集菌体，重悬于新鲜的含 500μg/ml 羧苄青霉素及 1mM IPTG 培养液中。30 培养 2 小时，收获菌体。



D. 影响表达的其它因素

T7 表达系统被用来表达多种真核和原核基因。然而，一些蛋白表达量很少，有些情况下原因明显，而有些情况其原因就不甚明了。目的蛋白自身可能会干扰基因的表达或者细胞的完整性。有时脉冲标记显示随着目的蛋白的积累蛋白合成的速度逐渐或迅速减慢，有时在目的蛋白能够被检测之前所有蛋白合成就已经停止。菌液裂解的情况也时有发生。下列几节简单概括了造成低水平表达的几个已知或可能的原因，并给出了使表达最优化的建议。

N-端原则

影响目的蛋白稳定性的一个因素是与 N-端 Met 相邻的氨基酸(即 N 端倒数第二个氨基酸)。这个位置上的氨基酸决定了 N-端 fMet 的去留。该反应由氨基肽酶催化，并由下列关系决定：随着倒数第二个氨基酸侧链大小的增加 fMet 去除的频率降低 (Hirel et al., 1989; Lathrop et al., 1992)。当下列这些氨基酸位于倒数第二个位置：His, Gln, Glu, Phe, Met, Lys, Tyr, Trp, Arg 时反应很少或不发生。余下的氨基酸在此位置上反应发生的频率从 16% - 97%。

细菌中蛋白 N 端氨基酸序列与其稳定性的关系取决于 N 端原则 (Tobias et al., 1991)。当下列氨基酸出现在氨基端：Arg, Lys, Phe, Leu, Trp 和 Tyr，蛋白的半衰期为 2 分钟。当其余的氨基酸出现在氨基端，蛋白的半衰期超过 10 小时。

结合上述两个因素，Leu 出现在倒数第二个位置上是最差的选择，因为在 fMet 反应之后它会暴露出来，随后引发蛋白快速降解。因此当 NdeI 被用作在 pET 载体中产生非融合蛋白时，在倒数第二个位置应当避免出现 Leu 密码子。当采用 NcoI 作为克隆位点时，由于倒数第二密码子以 G 起始，Leu 密码子不可能出现在该位置上。

二级翻译起始位点

有时除了全长目的蛋白还会发现未完全表达的截短蛋白。一个显见的解释就是蛋白降解；而次翻译起始位点是另一种可能 (Halling and Smith, 1985; Preibisch et al., 1988)。若一个类似核糖体结合位点(AAGGAGG)的序列加上适当的间隔序列(一般为 5 - 13 核苷酸)，位于 AUG(Met)密码子上游，会发生上述情况。当试图纯化全长蛋白时，截短蛋白会成为一个麻烦。一个可能的解决方法是采用 pET 载体，可以在两端都有融合标签。一些 pET 载体 N 端和 C 端都有 His•Tag 融合标签。全长蛋白较之截短蛋白采用更高的咪唑浓度进行洗脱。其他 pET 载体在目的蛋白的两端采用不同的标签，如 T7•Tag, S•Tag, GST•Tag 和/或 CBD.Tag 在 N 端 His•Tag 在 C 端。进行亲和纯化可以分离全长目的蛋白。



mRNA 转录产物的二级结构

mRNA 转录产物的二级结构可能干扰 AUG 翻译起始密码子和核糖体结合位点 (Tessier et al., 1984; Looman et al., 1986; Lee et al., 1987)。所有的 pET 载体将产生下列转录产物之一：

rbs *Nde I/Nco I*

5'...AAGAAGGAGAUAUACAUAUG...3'

5'...AAGAAGGAGAUAUACCAUGG...3'

如果发现表达水平很低，可以在编码链上寻找与上述序列互补的序列 (如 5' - CATATGTATATCTCCTTCTT-3', 或 5'-CCATGGTATATCTCCTTCTT-3')，以确定是否存在二级结构影响表达的可能性。

意外终止密码子

意料之外的突变可能引入终止密码子，特别是克隆 PCR 产物。测序可以发现这些突变，通过体外翻译测定重组子产生目的蛋白的能力也是一种方法。可使用 Novagen 的 EcoPro™ T7 系统 (见 25 页) 方便地进行测试。

转录终止子

一些外源蛋白，无论载体上有无 T₇ 转录终止子，其产量都大致相同。而在某些情况下，目的基因后带有 T₇ 转录终止子会增加目的蛋白的产量；当目的基因带有自身的翻译起始信号时，会发生此类情况 (Studier et al., 1990)。一个可能的解释就是一些翻译起始信号竞争不过 *bla* mRNA，它是在一些 amp^R pET 载体中与目的 mRNA 一起产生的。由于 T₇ 转录终止子会减少此类竞争 mRNA 的数量，导致目的蛋白的产量提高。在所有卡那抗性 pET 载体和氨苄抗性 pET-43.1 和 pET-44 载体中 kan 或 amp 基因与目的基因的方向相反，所以不会有竞争 mRNA 与目的 mRNA 一起产生。

不稳定目的 mRNA 及蛋白

在大多数情况下，都会有大量的目的 mRNA 积累，目的 mRNA 的不稳定性仍可能限制表达水平。尽管 BL21 菌株是 *lon* 和 *ompT* 蛋白酶缺陷型，该菌株中产生的许多蛋白都可以稳定存在，目的蛋白的不稳定性还是需要考虑的。一些由框外融合产生的小蛋白在该菌株中很稳定，然而其他一些会被迅速降解，使它们不会被脉冲标记检测出来。



VI. 目的蛋白分析

本章讨论目的蛋白分离的方法以备分析和纯化。对于每个目的蛋白，确定其产生、定位及估计培养基或细胞中的产量都相当重要。为了简化确定工作，通常对总细胞蛋白及培养液、周质、可溶胞质和不溶胞质部分进行小规模分析。分析的结果有利于诱导条件优化或确定大规模诱导条件，以及根据此章所描述的一些蛋白抽提方法用来纯化目的蛋白。

除了分析这四个组分，当要筛选多个克隆时，采用 PopCulture™ 试剂对诱导培养液进行快速筛选分析相当有效。PopCulture 快速筛选无需收集细胞就可以在培养液中直接迅速确定蛋白活性及表达水平。

优化 SDS-PAGE 电泳上样体积

为了简化凝胶电泳和 Western 分析，可以用两张工作表来记录数据和计算对标准小块胶规格化的上样体积（见 45 页）。公式取决于准确的 OD₆₀₀ 的读数以及浓度系数的获得。样品浓度系数等于初始培养液体积除以最终体积。

生长和诱导

1. 按如下操作准备 pET 重组子（DE3 溶原菌）的起始培养液：从平板或甘油保存菌中接一环细胞加入 3ml 含有适当抗生素的培养液中。
2. 37 °C 250rpm 培养至 OD₆₀₀ 约为 0.5。取 3ml 培养液加入 100ml 含抗生素的培养基中。这个体积适合最初的四步分析，当然也可以根据需要进行调整。
3. 在适当温度摇床培养至 OD₆₀₀ 约为 0.5-1.0（如 LB 培养基 2 - 3 小时，37 °C）。生长过程中无菌条件下取出样品测定 OD₆₀₀ 值。
4. 在诱导之前，将 100ml 培养液分为 2 份各 50ml。其中一份加入 IPTG，另一份不加 IPTG 作为不诱导对照。对于带有 T7lac 启动子的质粒，加入 IPTG 至终浓度 1mM（500μl 无菌的 100mM IPTG），而对于普通 T7 启动子加入 200μl IPTG 至终浓度为 0.4mM。对于 lacY 突变菌株（Tuner，Rosetta-gami 和 Origami B）可改变 IPTG 浓度。在适当温度培养适当的时间。注意，当融合蛋白被运输至周质，延缓诱导（16 小时或过夜）可以促进蛋白渗漏入培养基中。

诱导培养物的光密度分析

1. 在诱导后收集细胞前，充分摇荡使上清液均匀，在诱导和未诱导的培养液中各取出 0.5-1ml。
2. 尽量准确的确定 OD₆₀₀ 值。可以通过用相同的培养基进行稀释（通常为 1 : 5 到 1 : 10 稀释）使 OD₆₀₀ 读数在 0.1 和 0.8 之间。
3. 在工作表中记录稀释倍数和 OD₆₀₀ 读数（见 45 页）。

**A. 用 PopCulture™快速分析表达水平、活性及可溶性**

在富集细胞之前，目的蛋白的表达水平和活性可以利用 PopCulture 试剂快速、直接检测而无需离心。另外，提取物可以离心分离为可溶和不溶的部分。

1. 诱导之后，取出 1ml 样品，加入 100µl 的 PopCulture 试剂。
2. 每 ml 培养原液中加入 40U (1µl 的 1 : 750 稀释物) rLysozyme™溶液，以促进细胞裂解。如果宿主菌包含 pLysS 和 pLysE，就不必加入 rLysozyme。

可选操作：

每 ml 培养原液中加入 1µl (25U) Benzonase 核酶降解 DNA 和 RNA 获得不粘稠的样品。rLysozyme 和 Benzonase 可在使用之前与 PopCulture 混和。

3. 室温静置 10 - 15 分钟。
4. 分析表达水平，目的蛋白活性和可溶性。

总细胞蛋白的 SDS - PAGE：将抽提物与等体积的 4 × SDS 上样缓冲液 (Cat. No. 70607-3) 混和，用于考马氏染色或 Western blotting 检测。如样品 OD 值在 3 - 5 之间，高表达量的蛋白用 10µl 样品进行考马氏染色就可以检测到。低表达水平或低细胞浓度则需要进行 Western blotting 检测。

定量分析：特定标签用于定量分析如 FRETWorks™ S*Tag™ 分析，S*Tag™ 快速分析，可以与 PopCulture 提取物相匹配。

目的蛋白定性分析：因为蛋白通常都可以保留其活性，蛋白特定活性及免疫分析可与 PopCulture 提取物相匹配。

可溶性：为了分析可溶和不溶组分，将粗提物 14000g 离心 10 分钟以分离组分。可溶组分：包含可溶组分的上清液可以用 SDS - PAGE (如上所述) 分析，或进行蛋白活性和定量分析。不溶组分：经加热，振荡混和或超声将沉淀重溶于 1ml 1% SDS。取样用 SDS-PAGE 分析或进行 S*Tag 快速分析或 FRETWorks S*Tag 分析 (如果目的蛋白含 S*Tag 序列)。

B . 细胞总蛋白(TCP) 组分

目的基因的表达可以通过在 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色分析总细胞蛋白 (TCP)。TCP 样品的分析也可以与其他组分分析平行操作，作为目的蛋白回收率的一个对照。

2 × SDS 上样缓冲液 =
125mM Tris-HCl,
pH6.8, 4% SDS, 5% 2-
ME, 150mM DTT,
20% 甘油, 0.01% 溴
酚蓝

1. 在细胞富集之前，取 1ml 培养液离心 1 分钟。去除上清液。倒置使沉淀流干，过多的培养基由纸巾吸干。
2. 与 100µl 的磷酸缓冲盐 (PBS) 混和以重悬沉淀。
3. 加入 100µl 的 4 × SDS 上样缓冲液与一个小枪头按如下设置进行超声波处理：电力水平 2 - 3，功率 20 - 30% (Branson Sonifier 450，超声条件可按仪器的不同而改变)。另外，将样品流经 27 gauge needle 几次以降低其粘稠度。
4. 迅速在 85 °C 加热样品 3 分钟使蛋白变性，SDS-PAGE 分析之前 - 20 °C 保存。

C . 培养基组分

通常在延缓诱导时、目的蛋白输出时或目的蛋白渗漏到胞外时，都建议进行培养基分析。一些被输出到周质的蛋白通过一个不甚知晓的渗漏现象渗漏到培养基中。在大多数情况下，培养基中的目的蛋白是由于细胞壁的破损而非真的分泌表达 (Stader and Silhavy, 1990)。

1. 取 40ml 培养液，4 × 10000g 离心 10 分钟富集菌体。
2. 将 1ml 上清液样品移入微离心管中。避免带入任何细胞沉淀。剩余的培养基可用于进一步分析。将细胞沉淀置于冰上直到进行周质组分分析。
3. 通过 TCA 沉淀或旋转过滤来收集培养基样品：
4. 取 40ml 培养液，4 × 10000g 离心 10 分钟富集菌体。
5. 将 1ml 上清液样品移入微离心管中。避免带入任何细胞沉淀。剩余的培养基可用于进一步分析。将细胞沉淀置于冰上直到进行周质组分分析。
6. 通过 TCA 沉淀或旋转过滤来收集培养基样品：

三氯乙酸沉淀 (TCA)

- a) 加入 100µl (1/10 体积) 的 100% TCA (W/V) 至 1ml 培养基中，振荡 15 秒。



默克中国

免费技术咨询热线 800-820-8872

上海代表处 021-62483388

北京代表处 010-85802406

广州代表处 020-83634531

Novagen 网站 www.novagen.com bioteam@merck-china.com

操作手册 TB055 第 10 版

Novagen

41



- b) 置于冰上至少 15 分钟。
- c) 14000g 离心 10 分钟。
- d) 去除上清
- e) 加入 100 μ l 丙酮，混和，14000g 离心 5 分钟洗涤沉淀两次，从沉淀中去除丙酮。风干沉淀（将管子打开至少 60 分钟，略微离心）。剩余丙酮的存在将使重溶变得更加困难。
- f) 加入 100 μ l 1 \times PBS（样品浓缩系数为 10）和 100 μ l 的 4 \times SDS 上样缓冲液。通过振荡混和或超声重溶。
- g) 迅速在 85 $^{\circ}$ C 加热样品 3 分钟使蛋白变性，SDS-PAGE 分析之前 - 20 $^{\circ}$ C 保存。

离心过滤

- a) 采用一个低分子量截留滤器（10KDa 或更低）按照厂商建议将 500 μ l 的培养基浓缩到 50 μ l，使浓缩系数约为 10。
- b) 离心之后，确定浓缩样品的体积，在工作表上记录下浓缩系数，将样品转入一干净的管子。
- c) 用与样品等体积的预热（大于 90 $^{\circ}$ C）2 \times SDS 上样缓冲液淋洗滤膜。随后将其与样品合并。
- d) 迅速在 85 $^{\circ}$ C 加热样品 3 分钟使蛋白变性，SDS-PAGE 分析之前 - 20 $^{\circ}$ C 保存。

注意：通过分析胞质的 6-磷酸葡萄糖脱氢酶可以将渗漏和细胞裂解区分开来（Buttistuzzi et al., 1977）。除非发生细胞裂解，培养基组分中该酶的水平一般非常低。



D. 细胞周质组分

当载体带有 *ompT*, *pelB*, CBD 或 DsbA/C 信号序列时, 目的蛋白可以被引导入周质空间。引导端是必须的, 但并不足以使之运输到周质中。 *E.coli* 中蛋白跨膜运输的原理并没有被完全弄清 (Wickner et al, 1991)。然而, 很明显的一个因素是空间运输取决于目的蛋白的成熟结构域, 它可被负责输出的蛋白伴侣 SecB 所识别。以下会介绍一种从 DE3 溶原菌中准备周质组分的简单方法 (Ausubel et al., 1989)。然而, 渗透休克的方法对于含有 pLysS 或 pLysE 的宿主菌并不合适, 因为 T7 溶菌酶会破坏内膜。

1. 重溶细胞沉淀 (由培养基样品的步骤 2 产生) 于 30ml 30mM Tris-HCl pH8 20% 的蔗糖中。加入 60 μ l 0.5 M EDTA, pH 8 (终浓度为 1mM)。加入磁力搅拌棒, 室温下缓慢搅拌 10 分钟。
2. 10000g 离心 10 分钟收集细胞。去除上清液。
3. 在 30ml 的冰冻的 5 mM MgSO₄ 中彻底重溶沉淀, 在冰上缓慢搅拌悬液 10 分钟。此时周质蛋白被释放入缓冲液中。
4. 10000g 离心 10 分钟收集细胞。将 1ml 上清液 (周质组分) 转移入微离心管。避免混入任何沉淀物。
5. 保存剩余的上清液以备活性分析。保存细胞沉淀物以备进一步的可溶和不溶胞质组分的处理。记录沉淀的重量。
6. 用上一章第 3 步所述的 TCA 沉淀或过滤的方法来浓缩周质组分。浓缩系数为 10 倍。
7. 加入等体积的 4 \times SDS 上样缓冲液, 85 $^{\circ}$ C 迅速加热 3 分钟使蛋白变性。 - 20 $^{\circ}$ C 保存以备 SDS - PAGE 分析。

注意: 可以通过利用光学显微镜比较渗透震动前后细胞的形状来判断该步骤成功与否。震动前细胞应当是柱状的。处理之后细胞应是圆或球形的。当然也可以通过分析葡萄糖 - 6 - 磷酸脱氢酶来区分一般的细胞裂解和渗透震动。除非由细胞裂解发生, 该酶在周质组分中的水平相当的低。

LaVallie 等人于 1993 年报道一种由 pET-32 载体产生的 *trxA* 融合蛋白的提取方法, 该方法与上述方法略有不同。

提取 *trxA* 融合蛋白:

1. 以冰冻的 20% 蔗糖, 2.5 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 重溶诱导细胞, 浓度达到 50D₅₅₀ 单位/ml, 冰浴 10 分钟。
2. 15000g 离心 30 秒, 取出沉淀再重溶于同样体积的冰冻的 2.5 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0。冰上静置 10 分钟。注意 EDTA 不与 His•Bind[®] 树脂相匹配。
3. 15000g 离心 10 分钟。上清液为渗透休克组分。用 SDS-PAGE 分析上清和沉淀。



E. 细胞质可溶部分组分

本节讨论分离可溶胞质组分的方法。采用 BugBuster® 蛋白抽提试剂较之将目的蛋白暴露于较高温度和氧化伤害的机械破碎方法更为迅速并可保留更多的目的蛋白活性。

BugBuster® 和 Benzonase® 核酸酶处理

BugBuster® 蛋白抽提试剂是一种温和的破坏 E.coli 细胞壁非机械方法，使可溶蛋白释放出来 (Grabski et al., 1999)。非离子和两性去污剂合理的配比使细胞壁穿孔而不使可溶蛋白变性。离心收集诱导的细胞，重溶于 BugBuster 中。加入小量的 rLysozyme™ 溶液以增加细胞裂解的效率，加入 Benzonase (一种基因工程核酸酶) 可以降低裂解液的粘度使纯化时流速提高。短暂的培养过程中，蛋白被释放，核酸被消化。离心净化后，低粘度的提取物可用来蛋白分析而目的蛋白可以直接用亲和色谱树脂纯化。详细信息见操作手册 TB245 (BugBuster) 和 TB261 (Benzonase)。

不同配比的 BugBuster 适合于不同的应用类型。

BugBuster 试剂	特征	货号	包装
BugBuster 蛋白抽提试剂	Tris-缓冲液 1X 浓缩倍数	70584-3	100 ml
		70584-4	500 ml
BugBuster HT 蛋白抽提试剂	Tris-缓冲 BugBuster 与 Benzonase 核酶 1X 浓缩倍数	70922-3	100 ml
		70922-4	500 ml
		70922-5	1 L
BugBuster 10X 蛋白抽提试剂	用合适的缓冲液稀释至 1X 浓缩倍数	70921-3	10 ml
		70921-4	50 ml
		70921-5	100 ml
BugBuster (无胸) 抽提试剂	PIPPS-缓冲 1X 浓缩倍数	70923-3	100 ml
		70923-4	500 ml

1. 如果不需要培养基和周质组分，用一个预先称重的离心管 10000g 离心收集细胞。倒出沉淀尽量去除液体。确定沉淀湿重。从中将分离可溶的胞质和周质组分。
2. 通过轻弹或温和振荡，室温下重溶‘周质处理’的第 5 步所得或上述所得沉淀于 BugBuster，其中每克湿重沉淀采用 5ml 的溶液。通常每 50ml 的培养液采用 2ml 的 BugBuster。
3. 每 1ml BugBuster 中加入 1KU 的 rLysozyme 溶液。在 pLysS 和 pLysE 宿主菌中不必加入溶菌酶。

可选做：

- a) 每 1ml 的 BugBuster 试剂中加入 1μl Benzonase 核酶。rLysozyme 和 Benzonase 可以与 PopCulture 预先混和，4 度保存，同天使用。
 - b) 加入蛋白酶抑制剂。
4. 在室温下在摇床上培养细胞悬浮液 10 - 20 分钟。
 5. 4 16000 g 离心 20 分钟以去除不溶的细胞残余物。沉淀用于分离‘不溶的胞质组分’见 43 页。
 6. 将上清液移入一新管中以备分析。取上清液中一样品与等体积的 4 × SDS 上样缓冲液混和。剩余的上清液可用来额外分析或纯化。
 7. 85 迅速加热 3 分钟以使蛋白变性，- 20 保存以备 SDS-PAGE 分析。



rLysozyme™溶液和冻融处理

该步骤采用 rLysozyme 和细胞冻融的方法来分离可溶蛋白。如果菌株中包含编码溶菌酶的质粒，不必额外加入溶菌酶。

- 1? 如果不需要培养基和周质组分，用一个预先称重的离心管 10000g 离心收集细胞。倒出沉淀尽量去除液体。确定沉淀湿重。
- 2? 采用步骤 1 或 ‘周质组分’ 中步骤 5 所得的沉淀，在 - 20 或 - 70 彻底冰冻沉淀。
- 3? 室温下在裂解缓冲液(50 mM Tris-HCl or NaH₂PO₄, pH 7-8, 5% glycerol, 50 mM NaCl)中完全融化和重悬冰冻细胞沉淀，其中每克湿重细胞采用 7ml 裂解缓冲液。如有必要加入蛋白酶抑制剂。

注意：在获得细胞悬液之前不可加入 rLysozyme。冻融步骤破坏了细胞膜使 rLysozyme 进入细胞壁。如果提早加入 rLysozyme，迅速增加的粘度会使细胞完全重悬变得困难，造成裂解不完全。

1. 每 1ml 的裂解缓冲液中加入约 7.5KU 的 rLysozyme。
2. 可选做：每 1ml 裂解缓冲液中加入 1μl (25U) 的 Benzonase 核酶以备重悬。不建议在无核酶操作中采用 Benzonase。其它降低粘度的方法包括剪切或沉淀核酸。
3. 室温摇床培养细胞悬浮液 10 - 20 分钟。在培养结束时提取物不应很粘。如果裂解在 4℃ 下进行，需要更长的培养时间。由经验决定。
4. 4 16000 g 离心 20 分钟以去除不溶的细胞残余物。沉淀用于分离 ‘不溶的胞质组分’，见 43 页。
5. 将上清液移入一新管中以备分析或纯化。取上清液中一样品与等体积的 4 × SDS 上样缓冲液混和进行 SDS-PAGE 分析。
6. 85℃ 迅速加热 3 分钟以使蛋白变性，- 20℃ 保存以备 SDS-PAGE 分析。剩余的可溶抽提物可用于进行其它分析或纯化。将提取物在冰上保存数小时或 - 20℃ 保存。



机械破碎

1. a) 如果不需要培养基和周质组分, 用一个预先称重的离心管 10000g 离心收集细胞。倒出沉淀尽量去除液体。确定沉淀湿重。从中将分离可溶的胞质和周质组分。完全重悬沉淀于 4ml 冰冷的 20 mM Tris-HCl pH 7.5 中, 得到 10 倍的浓缩系数 (40ml 培养液到 4ml 缓冲液)。如有必要加入蛋白酶抑制剂。

或者

- b) 完全重悬由 '周质组分' 步骤 4 所产生的沉淀于 4ml 冰冷的 20 mM Tris-HCl pH 7.5 中, 得到 10 倍浓缩物 (40ml 培养液到 4ml 缓冲液)。如有必要加入蛋白酶抑制剂。

注意: 在细胞裂解时, 含有盐的缓冲液中一些蛋白可能有更高的溶解性。如有必要, 可在该缓冲液中加入终浓度至 0.5M 的 NaCl。其它一些诸如膜蛋白, 在裂解缓冲液中加入一种两性去污剂 (e.g., 10 mM CHAPS) 可以使之成为可溶组分。

2. 按下述方法中的一种完全裂解细胞

a) 弗氏压碎法

- b) 超声波处理。采用功率水平 4 - 5, 40 - 50% 能率 15 - 20 脉冲, 在冰上旋转、超声。在超声过程中保持样品冷却相当的重要, 这可避免了蛋白的热变性。上述设置仅为一般推荐, 也可根据指定超声仪自行调整。

3. 加入终浓度为 45 - 60KU/每克细胞糊的 rLysozyme™ 溶液。上下轻弹混和。超声前 30 度培养 15 分钟。如是 pLysS 或 pLysE 宿主菌就不必加入溶解酶。

注意: 通过一时间过程分析可以找到一指定超声仪的最优化条件。超声过程中在不同时段取出样品, 12000g 离心 5 分钟, 随后按照标准的分析方法, 如 Bradford, BCA 确定上清液中蛋白的浓度。当上清液中蛋白浓度达到一稳定水平时, 可进行下一步操作。

- 4? 整个裂解液或者 1.5ml 裂解液样品 (用作 SDS-PAGE 分析) 14000g 离心 10 分钟以分离可溶和不溶组分。
- 5? 将 100μl 可溶上清液 (取自 1.5ml 样品) 移入一新管中以备 SDS-PAGE 分析。加入 100μl 的 4 × SDS 上样缓冲液和水。85 迅速加热 3 分钟以使蛋白变性, -20 保存以备 SDS-PAGE 分析。
- 6? 如有所需保存剩余上清液以备活性分析或蛋白纯化。
- 7? 整个过程中将不溶的沉淀组分存于冰上, 以备下一步操作。



F. 细胞质不溶组分

胞质不溶组分包括细胞剩余物和聚集在一起以包涵体形式存在的目的蛋白。包涵体可以通过重复离心和洗涤步骤进一步纯化。然而，产物有可能在某种程度上被其它一些蛋白和核酸所污染。在一些情况下，纯化了了的包涵体适于直接用作抗原以准备目的蛋白的抗体(Harlow and Lane, 1988)。一些与不溶组分结合在一起的目的蛋白可能不在包涵体中。膜相关的目的蛋白为不溶组分，在细胞裂解时采用去污剂它会变为可溶组分。

BugBuster 试剂处理后的包涵体纯化

1. 将由“ BugBuster 和 Benzonase 核酶分离 ”步骤 5 所产生的不溶沉淀物用同等体积的 1 × BugBuster 重悬。上下轻弹振荡以得到均匀的悬浮液。为了溶解和去除污染蛋白，完全重悬沉淀对于得到高纯度的组分相当的重要。
2. 加入 rLysozyme 溶液至终浓度为 1KU/ml。轻微振荡混和室温培养 5 分钟。
3. 在重悬液中加入 6 倍体积的 1 : 10 稀释过的 BugBuster 试剂，振荡 1 分钟。
4. 5000g 4°C 离心 15 分钟以收集包涵体。去除漂浮物。
5. 在原始体积 1 : 10 BugBuster 中重悬包涵体，振荡混和，按第 5 步离心。去除上清，重复该步骤。再一次重悬，16000g 4°C 离心 5 分钟，去除上清。
6. a) 普通的 SDS-PAGE 分析，在 1.5ml 1% SDS 上样缓冲液中重悬沉淀，如有必要进行加热和振荡混和或超声(在该体积中浓缩因子仍为 10)。将 100μl 样品与 100μl 的 4 × SDS 上样缓冲液混和。85°C 迅速加热 3 分钟以使蛋白变性，-20°C 保存以备 SDS-PAGE 分析。
b) 为了纯化的话，将沉淀重悬于你挑选的变性缓冲液中，最好是可以与纯化方法相匹配的缓冲液。包涵体重悬于由 Novagen 的蛋白再折叠试剂盒提供的溶解缓冲液中或其它的变性缓冲液中。

机械性裂解细胞的包涵体纯化

普通的 SDS-PAGE 分析

1. 洗涤不溶的沉淀并重悬沉淀于 750μl 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10000g 离心 5 分钟。去除上清重复洗涤的步骤。
2. 在 1.5ml 1% SDS 上样缓冲液中重悬沉淀，如有必要进行加热和振荡混和或超声(在该体积中浓缩系数仍为 10)。
3. 将 100μl 样品与 100μl 的 4 × SDS 上样缓冲液混和。85°C 迅速加热 3 分钟以使蛋白变性，-20°C 保存以备 SDS-PAGE 分析。

蛋白纯化

1. 洗涤不溶的沉淀并重悬沉淀于 16ml(每 40ml 培养液体积)适当的缓冲液(不含去污剂)，以备树脂纯化。
2. 短暂超声以彻底重悬沉淀并剪切 DNA。
3. 5000g 离心 15 分钟收集包涵体和细胞剩余物，将其它蛋白留在溶液中。
2. 去除上清，重悬沉淀于 20ml(每 40ml 培养液体积)不含去污剂的缓冲液中。重复步骤 3。重悬沉淀可能需要超声。反复重复该步骤多次可释放更多的截留蛋白。

去除上清，重悬沉淀于 5ml 含有去污剂的缓冲液中以使包涵体溶解，最好是采用与纯化方法相匹配的缓冲液。最后的沉淀物重悬于与由 Novagen 的蛋白再折叠试剂盒提供的溶解缓冲液中或其它的变性缓冲液相匹配的缓冲液中。

5. 完全或部分变性的包涵体可以用 His⁷ Tag 或 S⁷ Tag 直接进行纯化。亲和纯化之前变性蛋白可先再折叠(见操作手册 TB234)。在某些情况下，将样品培养在冰上 1 小时以上可以帮助包涵体溶解。



G. 用 PopCulture™试剂制备抽提物

PopCulture 试剂无需富集细胞可以在培养液中直接抽提由 *E.coli* 的产生的蛋白。采用该方法，细胞培养，蛋白抽提和纯化都可以在原先的培养试管、烧瓶或多槽平板中进行(Grabski et al., 2001; Grabski et al., 2002)。

在有 rLysozyme 存在的情况下，经诱导的 *E.coli* 培养液在室温下用 PopCulture 试剂处理 10-15 分钟；如有必要也可以用 Benzonase 核酶处理。PopCulture 提取物可以直接用来蛋白分析，诸如 FRETWorks™S•Tag™，S•Tag 或 GST•Tag 检测。该提取物可直接与相应树脂混和(如 GST•Mag™，His•Mag™)以进行纯化。PopCulture 试剂也有 96 孔高通量处理的试剂盒用以处理带有“His•Tag”或“GST•Tag”的融合蛋白(见操作手册 327)。

1. 在经诱导的培养液中加入 0.1 倍体积的 PopCulture 试剂。
2. 每 ml 原始培养液体积中加入 40U (1μl 以 1:750 稀释) rLysozyme 溶液。如是带有 pLysS 或 pLysE 质粒的宿主菌，就不必额外加入溶菌酶。

可选做：

每 1ml 初始培养液中加入 1μl (25 U) Benzonase 核酶。rLysozyme 和 Benzonase 可以与 PopCulture 预先混和，应在当天使用。

3. 上下摇动混和室温培养 5-10 分钟。
4. 提取物可直接进行分析或与相应的色谱树脂混和。

总细胞蛋白的 SDS-PAGE 分析：提取物与同等体积的 4X SDS 上样缓冲液相混和用于考马斯亮蓝染色检测或 Western blotting。当 OD 值到 3-5，高表达的蛋白可通过考马氏检测。低表达水平或浓度可通过 Western blotting 检测。

定量分析：可用 FRETWorks，S•Tag 分析，S•Tag 快速分析和 GST•Tag 对融合蛋白进行定量分析。该分析与 PopCulture，Bradford 和 BCA 蛋白分析相匹配。

目的蛋白特定分析：由于用 PopCulture 提取的蛋白通常仍保有活性及构象，所以可以直接进行蛋白特定活性及免疫检测。

纯化：PopCulture 以 Tris 缓冲液为主要成分，并在中性条件下可与 His•Bind 和 GST•Bind 缓冲液相匹配。利用 His•Mag 或 GST•Mag 琼脂糖珠可使整个纯化过程仅需在一个试管中操作，无需离心和额外柱子。RoboPop 可提供 96 孔的高通量 His•Tag 或 GST•Tag 融合蛋白的纯化操作试剂盒。PopCulture 与一些其它的亲和纯化树脂相匹配。

VII. 目的蛋白的鉴定和定量

可通过 SDS-PAGE 分析快速确定蛋白表达，经考马氏亮蓝染色后，与未诱导的培养液对比会显出一条独特的目的蛋白带。Western-blotting 对于鉴定和估计表达水平是更为专一和敏感的方法。用融合标签专一性试剂和蛋白特定抗体或其它配基可方便的进行该操作。活性分析取决于蛋白种类，往往在纯化之后进行。由 PopCulture 试剂提取的粗提物可直接进行活性分析。(见 *PopCulture* 快速检测，见 39 页)。

A. 标准 SDS-PAGE 凝胶上样

根据 OD₆₀₀ 值将样品标准化，考马氏蓝带的强度会准确反应不同组分中目的蛋白的相对含量。Perfect Protein™ Markers (货号 69149-3 或 69079-3) 或 Trail Mix™ Markers (货号 70980-3) 提供了 10 kDa 至 225 kDa 大小的标准参照。

工作表 1：培养液 OD₆₀₀ 值的确定。

	稀释倍数 (DF)	稀释样品的 OD ₆₀₀ 值	富集 OD ₆₀₀ (DF × 稀释样品的 OD ₆₀₀ 值)
诱导培养液			
未诱导培养液			

工作表 2：决定标准的样品体积。样品的浓缩倍数等于初始培养液体积除以最终组分的体积。如起始培养液为 1ml，最终组分体积为 100 μl，那么样品浓缩系数为 10。如果用更大的胶，加样体积相应放大。必须计算每种样品的上样体积，因为各组分的浓缩系数不同。

	样品浓缩系数	富集 OD ₆₀₀	Z (浓缩系数 × OD ₆₀₀)	上样体积	
				15 孔小胶	10 孔小胶
				180 μl, Z	270 μl, Z
诱导培养液					
TCP					
培养基					
周质					
可溶胞质					
不溶组分					
未诱导培养液					
TCP					
周质					
培养基					
可溶胞质					
不溶组分					

**B. 融合标签的检测/分析工具**

目的蛋白的种类和量可以通过 Western blotting测定, 利用蛋白特定抗体或 pET 载体上的融合标签也可以进行定量分析。Western blotting和 Novagen 的快速检测试剂的操作手册在 www.novagen.com 及下表中列出。

在紧连样品的槽中加入 Western Blot Markers (货号 69959-3) 或 Trail Mix™ Western Markers (71047-3, 71048-3) 以便估计蛋白的大小。两个 markers 都带有 S•Tag 和 His•Tag 序列因此它们可以用 S-蛋白配基或 His•Tag 单克隆抗体进行检测(Fourrier and Hayes, 2001)。

Western Blotting	货号	包装	操作手册编号/应用
CBD• Tag™ 检测			
CBD _{cloS} •Tag Antibody	70119-3	25 µl	Polyclonal, WB
CBD _{cenA} •Tag Antibody	70157-3	500 µl	Polyclonal, WB
CBD _{cec} •Tag Antibody	70158-3	500 µl	Polyclonal, WB
GST• Tag 检测			
GST•Tag Monoclonal Antibody	71097-3	50 µg 250 µg	TB325 IF, IP, QA, WB
His• Tag® 检测			
His•Tag Monoclonal Antibody	70796-4 70796-3	3 µg 100 µg	TB283 IF, IP, WB
His•Tag AP Western Reagents	70972-3	25 blots	TB283 色度检测
His•Tag AP LumiBlot™ Reagents	70973-3	25 blots	TB283 化学荧光检测
His•Tag HRP LumiBlot Reagents	70974-3	25 blots	TB283 化学荧光检测
HSV• Tag® 检测			
HSV•Tag Monoclonal Antibody	69171-3 69171-4	40 µg 200 µg	TB067 WB
Nus• Tag™ 检测/分析			
Nus•Tag Monoclonal Antibody	71127-3 71127-4	50 µg 250 µg	TB328 WB
S•Tag 检测/分析			
S-protein AP Conju gate	69598-3	50 µl	TB097 WB
S-protein HRP Conju gate	69047-3	50 µl	TB136 WB
Biotinylated S-protein	69218-3	250 µl	WB
S-protein FITC Conju gate	69060-3	200 µl	TB143 IF
S•Tag AP Western Blot Kit	69213-3	25 blots	TB082 色度检测
S•Tag AP LumiBlot Kit	69099-3	25 blots	TB164 化学荧光检测
S•Tag HRP LumiBlot Kit	69058-3	25 blots	TB145 化学荧光检测
T7• Tag® 检测			
T7•Tag Monoclonal Antibody	69522-3 69522-4	50 µg 250 µg	TB015 IF, IP, WB
Biotinylated T7? Tag Antibody	69968-3	125 µl	TB106 WB
T7•Tag Antibody HRP Conju gate	69048-3	100 µl	TB137 WB
T7•Tag Antibody AP Conju gate	69999-3	50 µl	TB112 WB
T7•Tag AP LumiBlot Kit	70237-3	25 blots	TB212 化学荧光检测
T7•Tag HRP LumiBlot Kit	70238-3	25 blots	TB213 化学荧光检测

IF = 免疫荧光, IP = 免疫沉淀, QA = 定量分析, WB = Western blotting

定量分析	货号	包装	操作手册编号/灵敏度
------	----	----	------------

FRETWorks™ S•Tag™ Assay Kit	70724-3 70724-4	100 assays 1000 assays	TB251; 荧光分析, 限度 < 1 fmol
S•Tag Rapid Assay Kit	69212-3	100 assays	TB082; 限度 20 fmol
GST•Tag™ Assay Kit	70532-3	100 assays	TB236; 色度分析, 限度 8 pmol
Western Blot 蛋白 Marker	货号	包装	操作手册编号/分子量大小
Perfect Protein™ Western Markers	69959-3	25 lanes	TB102; 15, 25, 35, 50, 75, 100 和 150 kDa
Trail Mix™ Western Markers	70982-3	25 lanes	TB310; 15, 25, 35, 50, 75, 100 and 150 kDa, 和 15, 16, 100 kDa 预染 marker

VIII. 目的蛋白的纯化

蛋白纯化的方法取决于多种因素，包括目的蛋白的属性，细胞内形成的区域与形式，pET 载体，宿主菌背景，及表达蛋白的应用。培养条件也会对目的蛋白的可溶性及形成区域产生极大影响。用 pET 系统表达的目的蛋白可用多种方法进行纯化。该系统的一大优势就是在多种情况下目的蛋白会累积到很高的水平，使其占到总细胞蛋白中的很大的比例。因此可以用 2-3 步很方便地将蛋白纯化出来。

pET 载体中的各种融合标签使各种亲和纯化的方法变得简单易行。通常只需一步亲和纯化就可将目的蛋白纯化出来。纯化步骤也包括用肠激酶，Xa 因子或凝血酶将部分或全部的融合标签切下来。在对目的蛋白纯化和活性分析之前，需要先做下列分析如：表达水平，细胞区域，可溶性分析。这些方法在 38-44 页有阐述。在下列组分中都有可能找到目的蛋白：可溶或不溶的胞质组分，周质或培养基。位于包涵体，培养基或周质空间的目的蛋白的后续纯化步骤相当的简便。



A. 纯化工具

下表简述了用于提取及亲和纯化的试剂。详细信息可以参考 www.novagen.com 上的操作手册。

抽提试剂	货号	包装	操作手册编号/结合能力及特征
BugBuster [®] 蛋白抽提试剂	70584-3 70584-4	100 ml 500 ml	TB245 采用 5 ml/g 湿细胞糊, Tris-缓冲
BugBuster HT 蛋白抽提试剂	70922-3 70922-4	100 ml 500 ml	TB245 采用 5 ml/g 湿细胞糊, Tris-缓冲并与 Benzonase 核酶预先混和。
BugBuster 10X 蛋白抽提试剂	70921-3 70921-4 70921-5	10 ml 50 ml 100 ml	TB245 用适当缓冲液稀释到 1 倍并采用 5 ml/g 湿细胞糊
BugBuster (无胶) 抽提试剂	70923-3 70923-4	100 ml 500 ml	TB245 采用 5 ml/g 湿细胞糊 PIPPS-缓冲
PopCulture [™] 试剂	71092-3 71092-4 71092-5	15 ml 75 ml 250 ml	TB323 采用 0.1 倍体积的培养液。
rLysozyme [™] 溶液	71110-3 71110-4 71110-5	300 KU 1200 KU 6000 KU	TB334 和 TB323 每 1ml PopCulture 用 40 U, 每 1ml BugBuster 用 1 KU
Benzonase [®] 核酶, 纯度 > 90%	70746-3 70746-4	10,000 U 2,500 U	TB245, 323, 261 每 ml 初始初始培养液采用 25 U
CBD• Tag[™] 纯化	货号	包装	操作手册号/结合能力及特征
CBiND [™] 100 树脂	70120-3	25 g	TB189 结合能力 40 mg/g 树脂
CBiND 200 树脂	70121-3	25 g	TB189 结合能力 5 mg/g 树脂
CBiND 300 筒	70124-3 70124-4	pkg/10 pkg/50	TB189 预装好, 结合能力 1.5 mg/筒
CBiND 900 筒	70132-3 70132-4	pkg/10 pkg/50	TB189 预装好, 结合能力 4.5 mg/筒
CBiND 备柱	70144-3 70144-4	pkg/12 pkg/60	TB189 预装好, 结合能力 10 mg/柱
GST• Tag[™] 纯化	货号	包装	操作手册号/结合能力及特征
GST•Bind [™] 树脂	70541-3 70541-4	10 ml 50 ml	TB235 结合能力 5–8 mg/ml 树脂
GST•Bind 缓冲液试剂盒	70534-3		TB235 可供 10 个 2.5 ml 柱
GST•Mag [™] 琼脂糖珠	71084-3 71084-4	2 × 1 ml 10 × 1 ml	TB235 磁珠, 结合能力高于 2 mg/ml 体积
BugBuster GST•Bind 纯化试剂盒	70794-3		TB235 GST•Bind 树脂和缓冲液, BugBuster, Benzonase 和色谱柱
PopCulture GST•Mag 纯化试剂盒	71113-3		TB235 处理 40 × 3 ml 培养液纯化大于 150 μg per 3 ml 培养液
RoboPop [™] GST•Mag 纯化试剂盒	71102-3		TB327 纯化大于 4.8 mg 每 96 孔
His• Tag[®] 纯化	货号	包装	操作手册号/结合能力及特征
Ni-NTA His•Bind [®] 树脂	70666-3 70666-4 70666-5	10 ml 25 ml 100 ml	TB273 结合能力 5–10 mg/ml 树脂
Ni-NTA Superflow	70691-3 70691-4 70691-5	10 ml 25 ml 100 ml	TB273 结合能力 5–10 mg/ml 树脂, 高流速及压力
Ni-NTA 缓冲液试剂盒	70899-3		TB273 所有缓冲液用以 Ni-NTA His•Bind 和 Ni-NTA Superflow 树脂。
His•Bind [®] 树脂	69670-3 69670-4 69670-5	10ml 50 ml 100ml	TB054 结合能力 8 mg/ml 树脂
His•Bind 缓冲液试剂盒	69755-3		TB054 所有缓冲液用于 His•Bind 树脂

His•Bind 柱	70971-3 70971-4	pkg/5 pkg/25	TB054 预装, 预电荷, 结合能力 10 mg /柱
His•Bind 快柱	70159-3 70159-4	pkg/12 pkg/60	TB054 预装, 预电荷, 需要真空, 结合能力 5 mg /柱
His•Bind Quick 300 筒	70155-3 70155-4	pkg/10 pkg/50	TB054 预装, 预电荷, 结合能力 0.5 mg /筒
His•Bind Quick 900 筒	70153-3 70153-4	pkg/10 pkg/50	TB054 预装, 预电荷, 结合能力 2 mg /筒
His•Mag 琼脂糖珠	71002-3 71002-4	2 ml 10 ml	TB054 磁性琼脂糖珠, 预电荷, 结合能力 5 mg 每 ml 珠
His•Bind 快速缓冲液	70665-3		TB054 所有缓冲液用以 His•Bind 柱, 快柱, 筒及 His•Mag 琼脂糖珠, 包括无电荷缓冲液
His•Bind 纯化试剂盒	70239-3		TB054 10 ml His•Bind 树脂, 缓冲液及色谱柱
BugBuster® Ni-NTA His•Bind 纯化试剂盒	70751-3		TB273 10 ml Ni-NTA His•Bind 树脂, BugBuster, Benzonase 及色谱柱
BugBuster His•Bind 纯化试剂盒	70793-3		TB054 10 ml His•Bind 树脂, 缓冲液, BugBuster, Benzonase 及色谱柱.
PopCulture™ His•Mag™ 纯化试剂盒	71114-3		TB054 处理 40 × 3 ml 培养液纯化大于 375 μg 每 3 ml 培养液
RoboPop™ His•Mag 纯化试剂盒	71103-3		TB327 纯化大于 12 mg 每 96 孔
S• Tag™ 纯化	货号	包装	操作手册号/结合能力及特征
S-protein 琼脂糖	69704-3 69704-4	2 ml 5 × 2 ml	TB087, TB160 纯化大于 1 mg 每 2 ml 树脂
S•Tag 凝血酶纯化试剂盒	69232-3		TB087 纯化及切割 大于 1 mg 目的蛋白每试剂盒(2 ml 树脂)
S•Tag rEK 纯化试剂盒	69065-3		TB160 纯化及切割 大于 1 mg 目的蛋白每试剂盒 (2 ml 树脂)
T7• Tag® 纯化	货号	包装	操作手册号/结合能力及特征
T•Tag 抗体琼脂糖	69026-3	2 × 1 ml	TB125 最小 300 μg T7•Tag β-半乳糖苷酶每 ml 树脂, 可以根据目的蛋白改变
T•Tag 亲和纯化试剂盒	69025-3		TB125 最小 300 μg T7•Tag β-半乳糖苷酶每 ml 树脂, 可以根据目的蛋白改变
蛋白酶及回收试剂盒	货号	包装	操作手册号/结合能力及特征
凝血酶, 限制级	69671-3	50 U	TB188
生物素凝血酶	69672-3	50 U	TB188
凝血酶裂解回收试剂盒	69022-3		TB188 50 U 生物素凝血酶及琼脂糖 以去除生物素凝血酶
重组肠激酶	69066-3	50 U	TB150
肠激酶裂解回收试剂盒	69067-3		TB150 50 U 重组肠激酶及 EKapture™ 琼脂糖 以回收重组肠激酶
Xa 因子, 限制级	69036-3	400 U	TB205
Xa 因子裂解试剂盒	69037-3		TB205 400 Xa 因子及 Xarrest™ 琼脂糖 以回收 Xa 因子



溶解与折叠

有多种方法用来使不溶蛋白再折叠(Marston and Hartley, 1990; Kurucz et al., 1995; Burgess, 1996; Frankel and Leinwand, 1996; Rudolph and Lilie, 1996; Mukhopadhyay, 1997)。大多数操作方法都是通过离心分离不溶的包涵体,随后在变性条件下溶解蛋白。目的蛋白经透析或非变性的缓冲液稀释进行再折叠。由于每种蛋白都有其独特的折叠属性,因此最优化的再折叠条件必须通过实验摸索。最佳的再折叠条件可通过小规模阵列的方法快速决定,所牵涉到的因素包括蛋白浓度,还原试剂,氧化还原处理,二价阳离子等。一旦最佳条件确定,可用于大规模的目的蛋白的再折叠。

Novagen的蛋白再折叠试剂盒在碱性 pH条件下采用 CAPS与 N-硫氰酸十二烷酯相混和使包涵体溶解,随后在 DTT 存在的条件下透析以促进再折叠。各种与蛋白溶解与再折叠有关的方法与因素在 www.novagen.com的操作手册 TB234 上有提到。

出自包涵体的蛋白 90%以上都是目的蛋白,无需进一步的纯化。His•Tag融合蛋白和 S•Tag融合蛋白在完全变性条件下(再折叠之前)可进行纯化(见操作手册 TB054)。另外,用 6M 尿素溶解的包涵体,经 2M 尿素稀释 S•Tag融合蛋白,在部分变性的条件下用 S蛋白琼脂糖进行纯化(见操作手册 TB160 或操作手册 TB087)。再折叠的融合蛋白可以在自然的条件用 His•Tag, S•Tag或其它亲和标签(如 GST•Tag, CBD•Tag 和 T7•Tag)进行亲和纯化。

IX. 诱导对照: 半乳糖苷酶重组物

所有的 pET 载体和系统都包括一个诱导对照,它是在相应的 pET 载体中插入 β -半乳糖苷酶基因。这些重组子可以用来确定大肠杆菌表达的水平,以及在天然和变性条件下亲和纯化的效率。详细的信息见第 17 页。

除了可以提供诱导条件的对照,这些菌株也可以用来测定用合适的蛋白酶切割 N-端融合序列的效率。由于表达的目的蛋白为 β -半乳糖苷酶,纯化和切割之后可以简单地进行酶活性分析。在诱导条件下 116 kDa 的 β -半乳糖苷酶以可溶的形式积累,按照合适亲和树脂的操作手册可以在天然条件下纯化目的蛋白以保留酶活性。该酶也可在变性条件下用尿素或胍进行纯化,但在活性分析之前需要复性。值得注意的是是一些宿主菌也会生成天然的 β -半乳糖苷酶,然而在大多数情况下天然的酶量是无法与由 pET 载体诱导产生的酶量相比的。

用具有位点特异性地蛋白酶处理纯化后的 β -半乳糖苷酶融合蛋白会产生一个 116 kDa 的大产物加上一个小产物(融合标签)。由于融合标签太小无法用凝胶分析,用亲和树脂分析切掉融合标签的蛋白是另一种方法。离心去除树脂,用 SDS-PAGE 分析未结合的上清液。如果切割完全,所有的目的蛋白都应在未结合的上清液中。

有功能的 β -半乳糖苷酶是一个四聚物蛋白,活性需要四聚物形成。切割和未切割的多肽链都是具有功能的。所以未结合的蛋白所代表的量小于切割产生的蛋白。因此活性分析只能作为蛋白酶消化的一个大致估计。

半乳糖苷酶分析

BetaRed (Cat. No. 70978-3) β -半乳糖苷酶检测试剂盒是一个分析细胞抽提物中 β -半乳糖苷酶活性快速、敏感的方法。BugBuster、PopCulture、PBS、Tris-裂解缓冲液、rLysozyme 和 Benzonase 核酶都与该分析试剂盒相匹配。显色的 BetaRed 分析是基于 ONPG 的分析方法敏感度(1 pg)的 10 倍以上。详细信息,见操作手册 TB303。



X. pET系统宿主菌以及噬菌体

用于蛋白表达的λDE3溶原菌

pET 表达宿主菌是λDE3溶原菌，是以 DE3 命名，适合克隆在 pET 中的目的基因蛋白表达。pLysS 和 pLysE 是与宿主菌相容的质粒编码 T7 溶菌酶，它是 T7RNA 聚合酶的抑制物。这些菌株用来抑制在诱导之前的 T7RNA 聚合酶的本底表达以稳定那些编码影响细胞生长及活性目的蛋白的重组子。

菌株	包装	感受态细胞 货号	甘油菌株 货号	应用
AD494(DE3)	0.2 ml		69020-3	胞质中二硫键的形成.
	0.4 ml	69013-3		
	1.0 ml	69013-4		
AD494(DE3)pLysS	0.2 ml		69021-3	
	0.4 ml	69014-3		
	1.0 ml	69014-4		
B834(DE3)	0.2 ml		69288-3	选择非 met 和 ⁵ -S-met 标签
	0.4 ml	69041-3		
	1.0 ml	69041-4		
B834(DE3)pLysS	0.2 ml		69289-3	
	0.4 ml	69042-3		
	1.0 ml	69042-4		
BL21(DE3)	0.2 ml		69387-3	保护 lon 和 ompT 蛋白酶对目的蛋白的降解
	0.4 ml	69450-3		
	1.0 ml	69450-4		
HT96™BL21(DE3)	1 plate	71012-3		
	4 plates	71012-4		
	20 plates	71012-5		
BL21(DE3) Singles™	11 rxn	70235-3		
	22 rxn	70235-4		
BL21(DE3)pLysS	0.2 ml		69388-3	
	0.4 ml	69451-3		
	1.0 ml	69451-4		
BL21(DE3)pLysS Singles	11 rxn	70236-3		
	22 rxn	70236-4		
BL21(DE3)pLysE	0.2 ml		69389-3	
BL21 trxB(DE3)	0.2 ml		70506-3	胞质中二硫键的形成，保护 lon 和 ompT 蛋白酶对目的蛋白的降解
	0.4 ml	70508-3		
	1.0 ml	70508-4		
BL21 trxB(DE3)pLysS	0.2 ml		70507-3	
	0.4 ml	70509-3		
	1.0 ml	70509-4		
BLR(DE3)	0.2 ml		69208-3	BL21 菌株 recA 衍生型用以保持带有复制序列质粒的稳定
	0.4 ml	69053-3		
	1.0 ml	69053-4		
BLR(DE3)pLysS	0.2 ml		69209-3	
	0.4 ml	69956-3		
	1.0 ml	69956-4		
HMS174(DE3)	0.2 ml		69381-3	K-12 菌株 recA 衍生型用以保持带有复制序列质粒的稳定
	0.4 ml	69453-3		
	1.0 ml	69453-4		
HMS174(DE3)pLysS	0.2 ml		69382-3	
	0.4 ml	69454-3		
	1.0 ml	69454-4		
HMS174(DE3)pLysE	0.2 ml		69393-3	



菌株	包装	感受态细胞 货号	甘油菌株 货号	应用																																																																																																																																																																		
NovaBlue(DE3)	0.4 ml	69284-3		<i>recA⁻ endA-lacI^q</i> 突变体提供高严谨控制, 建议采用 NovaTope™ 系统																																																																																																																																																																		
	1.0 ml	69284-4			Origami™(DE3)	0.2 ml		70617-3	胞质中二硫键的形成.	0.4 ml	70627-3		1.0 ml	70627-4		Origami(DE3) Singles	11 rxn	70630-3			22 rxn	70630-4		Origami-(DE3)pLysS	0.2 ml		70618-3		0.4 ml	70628-3		1.0 ml	70628-4		Origami(DE3)pLysS Singles	11 rxn	70631-3			22 rxn	70631-4		Origami B(DE3)	0.2 ml		70830-3	增加含有稀, 码子(AGA, AUA, CUA, CCC, GGA). 蛋白在大肠杆菌中的表达. Tuner™(<i>lacYI</i>)衍生型使所有细胞都保持低水平表达以增加可溶性和活性.	0.4 ml	70837-3		1.0 ml	70837-4		Origami B(DE3)pLysS	0.2 ml		70832-3		0.4 ml	70839-3		1.0 ml	70839-4		Rosetta™(DE3)	0.2 ml		70950-3	增加含有稀, 码子(AGA, AUA, CUA, CCC, GGA). 蛋白在大肠杆菌中的表达. Tuner™(<i>lacYI</i>)衍生型使所有细胞都保持低水平表达以增加可溶性和活性.	0.4 ml	70954-3		1.0 ml	70954-4		Rosetta(DE3) Singles	11 rxn	71099-3			22 rxn	71099-4		Rosetta(DE3)pLysS	0.2 ml		70951-3		0.4 ml	70956-3		1.0 ml	70956-4		Rosetta(DE3)pLysS Singles	11 rxn	71100-3			22 rxn	71100-4		Rosetta-gami™(DE3)	0.2 ml		71062-3	增加含有稀, 码子(AGA, AUA, CUA, CCC, GGA). 蛋白在大肠杆菌中的表达. 胞质中二硫键的形成.	0.4 ml	71055-3		1.0 ml	71055-4		Rosetta-gami(DE3)pLysS	0.2 ml		71064-3		0.4 ml	71057-3		1.0 ml	71057-4		RosettaBlue™(DE3)	0.2 ml		71066-3	增加含有稀, 码子(AGA, AUA, CUA, CCC, GGA). 蛋白在大肠杆菌中的表达并且 <i>recA⁻ endA-lacI^q</i> 突变体提供高严谨控制	0.4 ml	71059-3		1.0 ml	71059-4		RosettaBlue(DE3)pLysS	0.2 ml		71068-3		0.4 ml	71034-3		1.0 ml	71034-4		Tuner™(DE3)	0.2 ml		70612-3	<i>lacYI</i> 突变体使所有细胞表达都可调节; 低 IPTG 水平可以增加蛋白的溶解性及活性.	0.4 ml	70623-3		1.0 ml	70623-4		Tuner(DE3)pLysS	0.2 ml		70613-3		0.4 ml	70624-3		1.0 ml
Origami™(DE3)	0.2 ml		70617-3	胞质中二硫键的形成.																																																																																																																																																																		
	0.4 ml	70627-3																																																																																																																																																																				
	1.0 ml	70627-4																																																																																																																																																																				
Origami(DE3) Singles	11 rxn	70630-3																																																																																																																																																																				
	22 rxn	70630-4																																																																																																																																																																				
Origami-(DE3)pLysS	0.2 ml		70618-3																																																																																																																																																																			
	0.4 ml	70628-3																																																																																																																																																																				
	1.0 ml	70628-4																																																																																																																																																																				
Origami(DE3)pLysS Singles	11 rxn	70631-3																																																																																																																																																																				
	22 rxn	70631-4																																																																																																																																																																				
Origami B(DE3)	0.2 ml		70830-3	增加含有稀, 码子(AGA, AUA, CUA, CCC, GGA). 蛋白在大肠杆菌中的表达. Tuner™(<i>lacYI</i>)衍生型使所有细胞都保持低水平表达以增加可溶性和活性.																																																																																																																																																																		
	0.4 ml	70837-3																																																																																																																																																																				
	1.0 ml	70837-4																																																																																																																																																																				
Origami B(DE3)pLysS	0.2 ml		70832-3																																																																																																																																																																			
	0.4 ml	70839-3																																																																																																																																																																				
	1.0 ml	70839-4																																																																																																																																																																				
Rosetta™(DE3)	0.2 ml		70950-3	增加含有稀, 码子(AGA, AUA, CUA, CCC, GGA). 蛋白在大肠杆菌中的表达. Tuner™(<i>lacYI</i>)衍生型使所有细胞都保持低水平表达以增加可溶性和活性.																																																																																																																																																																		
	0.4 ml	70954-3																																																																																																																																																																				
	1.0 ml	70954-4																																																																																																																																																																				
Rosetta(DE3) Singles	11 rxn	71099-3																																																																																																																																																																				
	22 rxn	71099-4																																																																																																																																																																				
Rosetta(DE3)pLysS	0.2 ml		70951-3																																																																																																																																																																			
	0.4 ml	70956-3																																																																																																																																																																				
	1.0 ml	70956-4																																																																																																																																																																				
Rosetta(DE3)pLysS Singles	11 rxn	71100-3																																																																																																																																																																				
	22 rxn	71100-4																																																																																																																																																																				
Rosetta-gami™(DE3)	0.2 ml		71062-3	增加含有稀, 码子(AGA, AUA, CUA, CCC, GGA). 蛋白在大肠杆菌中的表达. 胞质中二硫键的形成.																																																																																																																																																																		
	0.4 ml	71055-3																																																																																																																																																																				
	1.0 ml	71055-4																																																																																																																																																																				
Rosetta-gami(DE3)pLysS	0.2 ml		71064-3																																																																																																																																																																			
	0.4 ml	71057-3																																																																																																																																																																				
	1.0 ml	71057-4																																																																																																																																																																				
RosettaBlue™(DE3)	0.2 ml		71066-3	增加含有稀, 码子(AGA, AUA, CUA, CCC, GGA). 蛋白在大肠杆菌中的表达并且 <i>recA⁻ endA-lacI^q</i> 突变体提供高严谨控制																																																																																																																																																																		
	0.4 ml	71059-3																																																																																																																																																																				
	1.0 ml	71059-4																																																																																																																																																																				
RosettaBlue(DE3)pLysS	0.2 ml		71068-3																																																																																																																																																																			
	0.4 ml	71034-3																																																																																																																																																																				
	1.0 ml	71034-4																																																																																																																																																																				
Tuner™(DE3)	0.2 ml		70612-3	<i>lacYI</i> 突变体使所有细胞表达都可调节; 低 IPTG 水平可以增加蛋白的溶解性及活性.																																																																																																																																																																		
	0.4 ml	70623-3																																																																																																																																																																				
	1.0 ml	70623-4																																																																																																																																																																				
Tuner(DE3)pLysS	0.2 ml		70613-3																																																																																																																																																																			
	0.4 ml	70624-3																																																																																																																																																																				
	1.0 ml	70624-4																																																																																																																																																																				



用于初始克隆、对照和表达的同基因宿主菌

这些菌株都是与λDE3 溶原菌同基因的，用以表达但缺乏 T7 RNA 聚合酶。利用λCE6 感染这些宿主菌可以进行 T7 表达，这些菌株也可以进行大肠杆菌启动子表达。仅 NovaBlue 菌株建议用来进行初始克隆。

菌株	包装	感受态细胞 货号	甘油菌株 货号	应用
AD494	0.2 ml		69032-3	胞质中二硫键的形成
	0.4 ml	69033-3		
	1 ml	69033-4		
BL21	0.2 ml		69386-3	保护 <i>lon</i> 和 <i>ompT</i> 蛋白酶对目的蛋白的降解
	0.4 ml	69449-3		
	1 ml	69449-4		
B834	0.2 ml		69287-3	选择非 met 和 ⁵ -S-met 标签
BLR	0.2 ml		69207-3	BL21 菌株 <i>recA</i> 衍生型用以保持带有复制序列质粒的稳定
	0.4 ml	69052-3		
	1 ml	69052-4		
HMS174	0.2 ml		69385-3	K-12 菌株 <i>recA</i> 衍生型用以保持带有复制序列质粒的稳定
	0.4 ml	69452-3		
	1 ml	69452-4		
NovaBlue	0.2 ml		69009-3	<i>recA</i> <i>endA-lacI</i> ^h 突变体提供高严谨控制
	0.4 ml	9825-3		
	1 ml	69825-4		
Origami™	0.2 ml		70616-3	胞质中二硫键的形成
	0.4 ml	70626-3		
	1 ml	70626-4		
Origami B	0.2 ml		70829-3	胞质中二硫键的形成，保护 <i>lon</i> 和 <i>ompT</i> 蛋白酶对目的蛋白的降解 Tuner™ (<i>lacYI</i>) 衍生型使所有细胞都保持低水平表达以增加可溶性和活性
	0.4 ml	70836-3		
	1 ml	70836-4		
Rosetta™	0.2 ml		70949-3	增加含有稀，码子(AGA, AUA, CUA, CCC, GGA). 蛋白在大肠杆菌中的表达。Tuner™ (<i>lacYI</i>) 衍生型使所有细胞都保持低水平表达以增加可溶性和活性。
	0.4ml	70953-3		
	1 ml	70953-4		
RosettaBlue™	0.2 ml		71065-3	增加含有稀，码子(AGA, AUA, CUA, CCC, GGA). 蛋白在大肠杆菌中的表达并且 <i>recA</i> <i>endA-lacI</i> ^h 突变体提供高严谨控制
	0.4 ml	71058-3		
	1 ml	71058-4		
Rosetta-gami™	0.2 ml		71061-3	增加含有稀，码子(AGA, AUA, CUA, CCC, GGA). 蛋白在大肠杆菌中的表达。胞质中二硫键的形成。
	0.4 ml	71054-3		
	1 ml	71054-4		
Tuner™	0.2 ml		70611-3	<i>lacYI</i> 突变体使所有细胞表达都可调节；Tuner™ (<i>lacYI</i>) 衍生型使所有细胞都保持低水平表达以增加可溶性和活性。
	0.4ml	70622-3		
	1 ml	70622-4		



pET 系统宿主菌感受态细胞套装产品

感受态细胞	包装	货号	菌株
(DE3) Competent Cell Set	0.2 ml each	71032-3	AD494(DE3); BL21(DE3); BL21(DE3) <i>trxB</i> ; BLR(DE3); HMS174-DE3); Origami™(DE3); Origami B(DE3); NovaBlue(DE3); Rosetta™(DE3); Tuner™(DE3)
(DE3)pLysS Competent Cell Set	0.2 ml each	71033-3	AD494(DE3)pLysS; BL21(DE3)pLysS; BL21(DE3) <i>trxB</i> pLysS; BLR(DE3)pLysS; HMS174(DE3)pLysS; Origami(DE3)pLysS; Origami B(DE3)pLysS; Rosetta(DE3)pLysS; Tuner(DE3)pLysS
AD494 Competent Cell Set	0.2 ml each	70231-3	AD494; AD494(DE3); AD494(DE3)pLysS
BL21 Competent Cell Set	0.2 ml each	70232-3	BL21; BL21(DE3); BL21(DE3)pLysS
BLR Competent Cell Set	0.2 ml each	70233-3	BLR; BLR(DE3); BLR(DE3)pLysS
HMS174 Competent Cell Set	0.2 ml each	70234-3	HMS174; HMS174(DE3); HMS174(DE3)pLysS
Origami Competent Cell Set	0.2 ml each	70670-3	Origami; Origami(DE3); Origami(DE3)pLysS
Origami B Competent Cell Set	0.2 ml each	70911-3	Origami B; Orgami B;(DE3); Orgami B(DE3)pLysS
Rosetta Competent Cell Set	0.2 ml each	70987-3	Rosetta; Rosetta(DE3); Rosetta(DE3)pLysS
RosettaBlue Competent Cell Set	0.2 ml each	71079-3	RosettaBlue; RosettaBlue(DE3); RosettaBlue(DE3)pLysS
Rosetta-gami Competent Cell Set	0.2 ml each	71080-3	Rosetta-gami; Rosetta-gami(DE3); Rosetta-gami(DE3)pLysS
Tuner™ Competent Cell Set	0.2 ml each	70726-3	Tuner; Tuner(DE3); Tuner(DE3)pLysS

pET 系统的 λ 噬菌体

λ 噬菌体	包装	货号	应用
Bacteriophage CE6	0.2 ml 10 ml	69390-3 69390-4	为宿主菌细胞提供 T7RNA 聚合酶
λ DE3 Lysogenization Kit	10 rxn	69734-3	将 λDE3 整合入大肠杆菌宿主细胞染色体以用来表达目的基因
λ DE3 Lysogenization Kit plus pLysS & pLysE	10 rxn	69725-3	

本操作手册由默克中国生化小组成员朱栋华、易芳和何煜共同翻译、编辑而成。由于时间仓促，知识有限，错误在所难免。真诚希望原核表达系统研究人员提出宝贵意见和建议，不胜感激！
免费咨询电话：800-820-8872

E - mail 地址：bioteam@merck-china.com