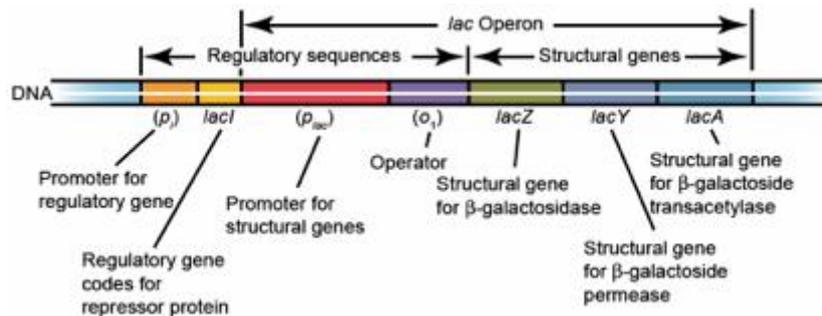


原核表达-IPTG 诱导表达原理及实验步骤

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

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

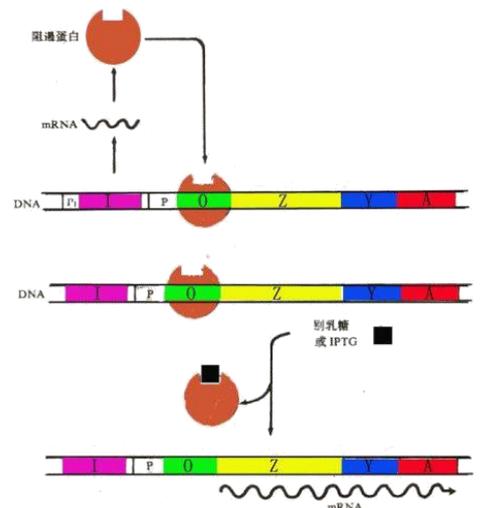


乳糖操纵子结构基因

IPTG 诱导原理

Lac 阻遏物是一种具有 4 个相同亚基的四级结构蛋白，都有一个与诱导剂结合的位点。在没有乳糖存在时，lac 操纵子 (元) 处于阻遏状态，Lac 阻遏物 (即下图中的阻遏蛋白) 能与操纵基因 O 结合，阻碍 RNA 聚合酶与 P 序列结合，阻止了转录的路径，从而抑制转录启动。而当有诱导剂 (这里指 IPTG) 存在时，诱导剂可与阻遏蛋白结合，使阻遏蛋白构象发生变化，导致阻遏物从操纵基因 O 上解离下来，RNA 聚合酶不再受阻碍，启动子 P 开始发生转录，启动反应开始发生转录。

在这个操纵子 (元) 体系中，真正的诱导剂并非乳糖本身。乳糖进入细胞，经β-半乳糖苷酶催化，转变为半乳糖——即生理上的诱导剂。而在实验中，通常选用异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 作为诱导剂，IPTG 是一



种作用极强的诱导剂，不被细菌代谢而十分稳定，因此被实验室广泛应用。

IPTG 诱导表达实验方法

材料

试剂和培养基	配料
LB (Luria—Bertani) 培养基	<ul style="list-style-type: none">● 酵母膏 (Yeast extract) 5g● 蛋白胨(Peptone) 10g● NaCl 10g● 琼脂(Agar) 1-2%● 蒸馏水 1L pH 7.0
IPTG 贮备液	<ul style="list-style-type: none">● 2g IPTG 溶于 10mL 蒸馏水中 0.22 μ m 滤膜过滤除菌，分装成 1mL/份，-20 $^{\circ}$ C 保存
凝胶电泳加样缓冲液	<ul style="list-style-type: none">● 50mmol/L Tris-CL(pH6.8)● 50mmol/L DTT● 2%SDS (电泳级)● 0.1%溴酚蓝● 10%甘油

原核表达鉴定详细实验步骤

1. 表达鉴定第一天的任务，常用抗性选择根据感受态细胞选择
 - 拿到质粒，离心 (3000r/min ; 2min)
 - 在质粒中加入 TE【使质粒最终加入到 110 μ L 感受态细胞中的量为 80-100ng，据此确定加入 TE 的量】，一般为(1 μ g 质粒加 20 μ L TE ; 2 μ g 质粒加 50 μ L TE ; 5 μ g 质粒加 100 μ L TE)
 - 将质粒与 TE 混匀，吸取 2 μ L 混液与感受态细胞混匀
 - 将感受态细胞放入冰箱 (4 $^{\circ}$ C) 中，30min
 - 取出后立即放入水浴锅中 (42 $^{\circ}$ C)，热激 90s,
 - 再次放入冰箱 (4 $^{\circ}$ C) 中，3min
 - 拿出后取 200 μ L 的 LB 液体培养基加入到已转入质粒的感受态细胞中

- 放入摇床 (37°C; 195r) 中, 30min 至 60min; (最佳 45min)
- 取出离心 (3000r/min ; 2min)
- 去掉 200 μ L 的上清, 留 100 μ L 左右上清悬浮沉淀, 吸取 50 μ L 悬液涂平板, 【先将对应抗性的平板放入培养箱 (37°C) 中预热 20min】
- 把平板放入培养箱 (37°C), 过夜 (12h 至 16h)

2. 表达鉴定第二天的任务, 注意 Pcold 表达载体的表达温度

- 每个平板挑取单菌落至 4 支对应抗性的 LB(4ml)试管中, 编号为 “0” “1” “2” “3”
- 将试管放入摇床 (37°C ; 195r) 中, 【单抗 3h 左右; 双抗 4h 左右; 刚开始用可见分光光度计测 OD 值; 熟练后可目测 (背光下, 以试管中的枪头为例, 刚刚看不见枪头即可)】, 测 OD 值 (0.6 至 0.8)
- 从 “0” 号管中取 700 μ L 悬液加入到 100 μ L (C=80%) 的保种甘油中, 震匀, 放入冰箱 (-20°C) 冻存
- 在每组菌的 “1” “2” “3” 号试管中分别加入 2 μ L 的 IPTG 【终浓度 0.5mM 最适, 可根据日后表达摸索】
- 视不同的载体选择适合的表达环境 【PET/PGEX : 15°C表达过夜; 25°C表达 6h ; 37°C表达 3h 至 4h (4 支试管, “0” “1” 号试管 15°C表达过夜; “2” “3” 试管 37°C表达 3h 至 4h)。Pcold : 【全部 15°C表达过夜】】

3. 表达鉴定第三天, 全菌的表达鉴定分析, 注意控制溶质的量及溶液黏度

- 从每组 4 支的试管中均取 500 μ L 菌液加入到 1.5ml 离心管中, 【若 OD 值不一样, 值小的可多取】离心 (6000r/min), 5min, 去上清, 留沉淀【沉淀少的, 可再取菌液离心, 尽量使沉淀量接近】
- 在每个离心管中加入 500 μ L 的 DDH₂O, 悬浮沉淀, 离心 (6000r/min), 5min, 去上清, 留沉淀
- 在每支离心管中加入 45 μ L 的 1 \times PBS 和 45 μ L 的 2 \times Loading Buffer 悬浮沉淀【当溶质适量且均一的情况下, 加入量不变; 当溶质多且粘稠时, 应使加入量增大, 为降低粘度也可减少上液量】
- 放入煮样器 (100°C) 25min
- 取出后离心 (6000r/min) 3min, 电泳检测。
- 蛋白表达量不错, 进行蛋白纯化; 蛋白表达量低或者没表达, 可参考[原核表达 FAQ](#) 相对应解决方案解决。

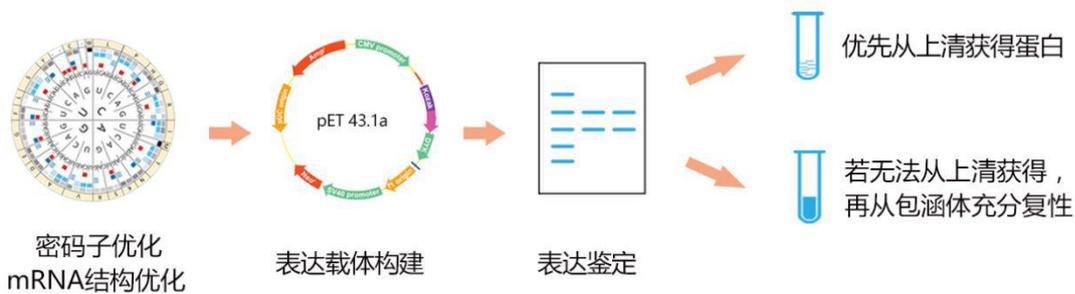
4. 蛋白纯化: 见[蛋白纯化专题](#)

南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

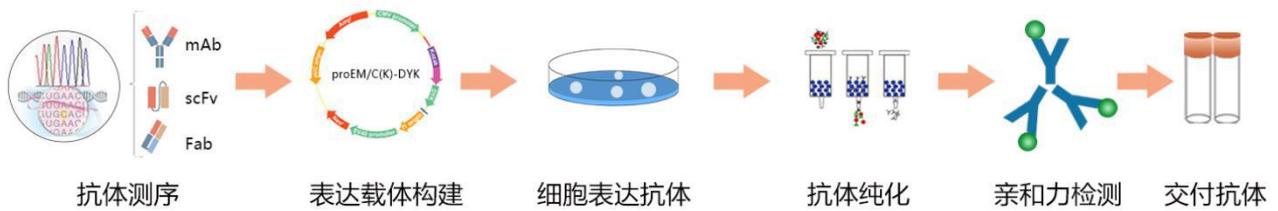
一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



二、蛋白表达（大肠杆菌表达）成功率>95%，不成功不收费，成功有保障



三、重组抗体表达 若想改造一个抗体，可以试试重组表达



四、稳定细胞系构建 研究级细胞系构建 & 高表达细胞株开发

