

重组蛋白质的表达、纯化、复性和定量

按 Qiagen 公司的操作手册进行，具体步骤如下。

一、重组蛋白质的诱导表达

1. 挑取转化有质粒的单菌落，接种于 3ml 选择性 LB 液体培养基中，37 oC，250 rpm/min 振荡培养过夜。
2. 次日将培养过夜的菌液 500 μ l 再接种于 10 ml(1:20)选择性 LB 液体培养基中，37 oC，250 rpm/min 振荡培养至光密度 (OD₆₀₀=0.6) 时，取 1 ml 样本作为诱导前标本，10000g 离心 1 min 收集菌体沉淀，-20 oC 冻存备用。
3. 加入 1 mol/L IPTG 于菌液中，使 IPTG 终浓度为 1 mM，37 oC，250 rpm/min 振荡培养 4~5 小时。取 1 ml 样本作为诱导后标本，同上法收集菌体沉淀，-20 oC 冻存备用。
4. 将诱导前后菌体沉淀用 20~40 μ l PBS (pH= 8.0) 重悬，加入等体积的 2 \times SDS 上样缓冲液，煮沸加热 5 min，SDS 聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳分离，考马斯亮蓝染色 3 小时后，脱色观察结果。
5. 选取诱导成功的细菌克隆，扩大诱导规模，收集菌体沉淀，于-20 oC 保存，准备做下一步分析及纯化。

二、重组蛋白质的分离纯化

重组蛋白质的可溶性鉴定

1. 将按上法诱导培养后收集的菌体重悬于裂解液 1 (Lysis buffer under native conditions) 中，然后在-80 oC 低温冰箱中放置 10 min。
2. 冰中解冻。
3. 在冰浴上用超声破碎仪破菌 6 次，每次 10 sec，间歇 10 sec，电压 200-300 V。
4. 10000g，4oC，离心 20 min，取上清 (为溶液 A)，-20 oC 保存；另将沉淀用同样裂解液 1 溶解 (为溶液 B)，同样-20 oC 保存，供后继分析使用。
5. 将上述 A、B 溶液和诱导前后的细菌进行 SDS-PAGE 电泳，考马斯亮蓝染色，比较分析重组蛋白质的溶解性。如果诱导表达的蛋白质位于 A 溶液中，则为可溶性蛋白；如果是在 B 溶液中，则为非可溶蛋白。

重组蛋白质为非可溶性蛋白 (变性条件下) 的分离纯化

1. 将菌体沉淀溶于适量裂解液 2 (Lysis buffer under denaturing conditions) 中，室

温下搅拌和吹打沉淀，避免泡沫生成。

2. 10000g, 4 oC, 离心 30 min, 收集上清液。

3. 将 Ni-NTA Agarose 充填柱子, 并连接于 Pharmacia 低压液相层析系统, 用 5 倍柱体积的裂解液 2 平衡 Ni-NTA Agarose, 调节 A280 值至零线。

4. 将适量上清液上样到 Ni-NTA Agarose 柱子中, 并用 lysis buffer 冲洗至 A280 值低于 0.01。

5. 分别用 5~10 倍柱体积的清洗液 1 和清洗液 2(Wash buffer 1 and 2)清洗柱子, 直至 A280 值低于 0.01。

6. 用洗脱液(Elution buffer)洗脱重组蛋白质, 在 A280 值监测下, 收集出现峰线后含有重组蛋白的所有洗脱液。

三、重组蛋白质的复性、冻干和定量

纯化后的蛋白用梯度降低的尿素溶液缓慢透析, 最终用 0.01×PBS 透析, 透析后的蛋白质溶液经冻干成粉状。以牛血清白蛋白(BSA)为标准, 采用 BIO-RAD 公司蛋白质定量试剂(protein assay)比色测定蛋白质的含量。