

做原核表达的几点教训和体会

最近在做原核表达，包涵体。以前也做过，但经验不多。一点失败的教训以及纯化过程中的体会，贴出来与大家共享，同时希望得到同行们的指正

1. 首先介绍一下背景。载体是 invitrogen 公司的 pET22b，Amp 抗性。菌株是该公司的 BL21 star DE3，是一个蛋白降解酶突变菌株，也就是说是一种优化表达菌株。

2. 第一次失败。第一次做诱导的时候，重复了很多次，但总是诱导不出来。PCR，酶切都正确。但没等测序结果出来就开始做了。失败了。曾在园子求助。后来证明是引物错误。我们实验室合成引物都要先发给 purchasing office，然后才由他们与公司交涉。这个 office 的老太太把引物弄掉了一个碱基。

教训：在实验过程中，再仔细都是不为过的。引物来了后管壁上贴有序列，但我忽略了。

3. 第二次失败。后来重新构建，转化，诱导。第一次诱导时根本就没带。见附图（图片质量太差了，sorry，下面几个帖会逐渐好转。我们都在失败中提高，进步，不是吗）

然后开始找闷头原因。周一下午 5 点我就接了 DE3 菌，由于那天人非常不舒服，去看医生了，等了很久，到第二天中午 11 点才转接！而且是按 1:50 转接的！也就是菌在转接之前培养了 18 h！

我们都知道，带 Amp 的 E.coli 在含 Amp 的平板上培养超过 16 h 后，菌周围会长出小菌落，我们叫它卫星菌落。这是因为细菌在生长的时候，为了抵抗 Amp，会分泌 B-内酰胺酶，而该酶会降解培养基中的 Amp。对 Amp 产生抗性的机制和其他抗生素的情况是不同的（具体可以翻看分子克隆）。到菌体生长到足够浓度的时候，培养基的 Amp 就会慢慢减少。一旦细菌失去选择压力，就可能造成质粒丢失。当 Amp 降到很低，不足以抑制细菌生长时，未携带质粒的菌就会长得比带质粒的快。所以当培养时间足够长后，培养基中的 B-内酰胺酶就会积累到很高的浓度。转接时（我是 1:50 转的），高浓度的酶可能破坏新鲜培养基中的 Amp（而且我用的浓度是 50 ug/ml）。这样，就造成最后收集的菌中，大部分都是没有带质粒的菌了。

当然还有一个可能的原因就是死亡的菌体分泌一些降解酶，使得表达检测失败。

这两种推测都只是推测，但我觉得第一种情况应该引起我们的重视。在使用 Amp 抗性的时候要格外注意。

4. 第三次做诱导就格外小心了。首先，晚上 12 点我才接菌，到第二天早上就开始转接了。这次用的是 100 ug/ul 的 Amp 浓度。转接的时候是 1:500 稀释。（我不知道 1:100 行不行，一朝被蛇咬，十年怕井绳啊。在 OD600 达到 0.8 的时候诱导。转接的时候做对照：IPTG 0 h，同时做诱导：2 h, 3 h

主要结果有三：

- A. 有表达，
- B. 阴性对照也有表达，所以这个结果不是很 convincing
- C. 目的蛋白应该在 30 kD，但分子量显示是 36 kD 左右（这个问题是个低级错误，接下来的帖子会指出）。

原因分析：

为什么阴性对照会有带？我想起表达毒性蛋白的 protocol. 表达毒性蛋白的时候，由于 DE3 可能根本就不长，或者长得很慢，这时候我们会在培养基中加 glucose。当培养基中有其他首选碳源，如 glucose 时，细菌会优先选择 glucose，而 glucose 会抑制 cAMP 的活性从而关闭乳糖操纵子。

为什么要加入 glucose 呢？我们用的 DYT 或者 LB 培养基中含有丰富的 tryptone。后者可能含有微量的乳糖。所以虽然没有加 IPTG，其中的 lactose 同样可能诱导蛋白的表达。这样毒性蛋白在加 IPTG 前就开始表达了，杀死或者抑制了细菌的生长。

那么我的这个实验中，阴性对照出现的带是不是也是因为这个原因引起的呢？要验证阴性对照中的带是不是由于培养基中的微量 lactose 的，可以做如下实验，A. 测培养基中乳糖含量；B. 购买无乳糖培养基；但是我不愿浪费时间在这上面。。。卖个关子哈

实际上，我做了如下的一组处理：

- a. 阴性对照+2%glucose
- b. 阴性对照 without glucose
- c. 诱导 2 h
- d. 诱导 3 h

这个处理其实存在设计上的错误。如果要得出严谨的结论，应该要加一个 2%glucose 的诱导处理。这样，预期的结果就是：

- a, 无目的条带，
- b, 有目的条带，但不够多，
- c, 有
- d, 有
- e, 2%glucose, 诱导，无目的条带或者仅有很浅的带。

很抱歉，e 没有做。那天很久没用的两瓶 glucose 中的一瓶被污染了。。。。

结论：培养基中确实很可能存在 lactose。而且应该是造成阴性对照有表达的原因。

现在头疼的就是分子量的问题了。首先，切胶做 MS。见附图。那三个洞洞就是偶挖滴。根据公司的报告，这个蛋白就是我们要的蛋白。然后就开始怀疑分子量 marker 了。细心的战友可能发现了，我下面这个图 marker 其实跟上面几个图都是一样的，但标的不一样了。这就是我说的低级错误：我之前的图是按 Tris-HCl buffer，12%的胶标的。但我跑的 Bis-Tris 胶，而且是 MES buffer。而 marker 在这两种 buffer（胶）中所代表的分子量是不同的。

apparent MW 跟 calculated MW 有时候是相差很大的。

把我的体会贴到这里，衷心希望与大家一起探讨。欢迎指正！

最后祝大家实验顺利！