

8. 大肠杆菌表达系统与蛋白表达纯化

大肠杆菌表达系统遗传背景清楚，目的基因表达水平高，培养周期短，抗污染能力强等特点，是分子生物学研究和生物技术产业化发展进程中的重要工具。因此熟练掌握并运用大肠杆菌表达系统的基本原理和常规操作是对每一个研究生来说是非常必要的。本章节介绍了实验室常用的大肠杆菌表达系统的构成特点，归纳了利用大肠杆菌表达系统纯化重组蛋白的基本流程和详细操作步骤，并且结合笔者的操作经验，总结了初学者在操作过程中可能遇到的问题和解决策略。

8.1 大肠杆菌表达系统的选择与构建

8.1.1 表达载体的选择

根据启动子的不同这些载体大致可以分为热诱导启动子，如 λ PL，cspA 等和另外一类就是广泛使用的 IPTG 诱导的启动子，如 lac，trc，tac，T5/lac operator，T5/lac operator 等。根据表达蛋白质的类型可分为单纯表达载体和融合表达载体。融合表达是在目标蛋白的 N 端或 C 端添加特殊的序列，以提高蛋白的可溶性，促进蛋白的正确折叠，实现目的蛋白的快速亲和纯化，或者实现目标蛋白的表达定位。常用的用于亲和纯化融合标签包括 Poly-Arg，Poly-His，Strep-Tag II，S-tag，MBP 等。其中 His-Tag 和 GST-Tag 是目前使用最多的。His Tag 大多数是连续的六个 His 融合于目标蛋白的 N 端或 C 端，通过 His 与金属离子： Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 的螯合作用而实现亲和纯化，其中 Ni^{2+} 是目前使用最广泛的。His 标签具有较小的分子量，融合于目标蛋白的 N 端和 C 端不影响目标蛋白的活性，因此纯化过程中大多不需要去除。目前常使用的表达载体主要是由 Novagen 提供的 pET 系列和 Qiagen 公司提供的 pQE 系列。除了 His 标签外，还原性谷胱甘肽 S-转移酶是另一种实验室常用的融合标签。它可以通过还原性谷胱甘肽琼脂糖亲和层析而快速纯化。此外，与 His 相比，GST 很多时候能够促进目标蛋白的正确折叠，提高目标蛋白表达的可溶性，因此，对于那些用 his 标签表达易形成包涵体的蛋白，可以尝试用 GST 融合表达来改进。当然，GST 具有较大的分子量（26kDa），可能对目的蛋白的活性有影响，因此很多时候切除 GST 是必须的。目前，GST 融合表达系统主要是由 GE Healthcare（原 Amersham）提供。

8.1.2 宿主菌的选择

重组质粒的构建一般选择遗传稳定，转化效率高，质粒产量高的菌株作为受体菌，常用的有 E. coli DH5 α ，E. coli JM 109，E. coli DH 10B，E. coli NovaBl μ e 等 recA⁻ 和 endA⁻ 型细胞。作为表达宿主菌必须具备几个基本特点：遗传稳定，生长速度快，表达蛋白稳定。具体操作过程中，根据所使用的表达载体的特点，目的基因密码子的组成等选择特定的表达宿主菌。以下是实验室常用的几种表达宿主：

BL2：lon 和 ompT 蛋白酶缺陷型，避免了宿主对外源蛋白的降解。是经典的使用最广泛的表达受体。适用于 Tac，Trc，Lac， λ PL，cspA 等作为启动子的载体。

BL21（DE3）：DE3 噬菌体溶源于 BL21 形成的带有染色体 T7 RNA 聚合酶

基因大肠杆菌。IPTG 诱导的 lacMV5 启动子控制 T7 RNA 聚合酶基因表达 T7 RNA 聚合酶，进而控制 T7 表达系统表达目的蛋白。

BL21 (DE3) 衍生系列：在经典的 T7 表达系统 BL21 (DE3) 的基础上，Novagen 公司开发了一些特殊的表达宿主细胞。比如：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。

Rosetta™ 系列：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。经提高稀有 tRNA 水平，可以提高一些真核基因表达效率（更多信息可参考相应公司的资料）。

BL21-Codon Plus 系列：包括 BL21-CodonPlus® (DE3)-RIPL, BL21-CodonPl μ s®-RIL, BL21-CodonPl μ s® (DE3) -RIL, BL21-CodonPl μ s®-RP, BL21-CodonPlus® (DE3) -RP 等。这些受体菌添加了大肠杆菌中编码精氨酸 (R)，亮氨酸 (L)，异亮氨酸 (I) 和脯氨酸 (P) 稀有密码子的 tRNA 基因，更多用于表达一些真核生物的基因。其中 RIL 系列常用于 AT 含量高的基因，而 RP 系列主要用于 GC 含量高的基因（更多信息参考 Stratagene 公司资料）。

M15/SG13009：自身表达 T5 RNA polymerase，主要用于 pQE 系列载体的表达。

另一个需要考虑的是大肠杆菌的密码子及其偏爱性。

表 1 大肠杆菌密码子使用频率统计

	T	AA	FRQ	C	AA	FRQ	A	AA	FRQ	G	AA	FRQ
T	TTT	F	19.7	TCT	S	5.7	TAT	Y	16.8	TGT	C	5.9
	TTC	F	15	TCC	S	5.5	TAC	Y	14.6	TGC	C	8
	TTA	L	15.2	TCA	S	7.8	TAA	stop	1.8	TGA	stop	1
	TTG	L	11.9	TCG	S	8	TAG	stop	0	TGG	W	10.7
C	CTT	L	12	CCT	P	8.4	CAT	H	15.8	CGT	R	21.1
	CTC	L	11	CCC	P	6.4	CAC	H	13.1	CGC	R	26
	CTA	L	5.3	CCA	P	6.6	CAA	Q	12.1	CGA	R	4.3
	CTG	L	46.9	CCG	P	26.7	CAG	Q	27.7	CGG	R	4.1
A	ATT	I	30.5	ACT	T	8	AAT	N	21.9	AGT	S	7.2
	ATC	I	30.6	ACC	T	22.8	AAC	N	24.4	AGC	S	16.6
	ATA	I	30.7	ACA	T	6.4	AAA	K	33.2	AGA	R	1.4
	ATG	M	30.8	ACG	T	11.5	AAG	K	12.1	AGG	R	1.6
G	GTT	V	16.8	GCT	A	10.7	GAT	D	37.9	GGT	G	21.3
	GTC	V	16.9	GCC	A	31.6	GAC	D	20.5	GGC	G	33.4
	GTA	V	16.1	GCA	A	21.1	GAA	E	43.7	GGA	G	9.2
	GTG	V	16.11	GCG	A	38.5	GAG	E	18.4	GGG	G	8.6

8.2 表达条件的建立

为了方便后续的纯化操作，保持目标蛋白的活性，提高蛋白的得率，我们在进行蛋白的大量制备之前应该首先确定目标蛋白的最佳表达条件。首先，保证表达蛋白稳定，尽量避免蛋白酶的降解，我们可以通过使用一些蛋白酶缺陷性的表

达宿主，其次在表达的过程中可以在培养体系中添加一些蛋白酶抑制剂等来解决。与实现外源蛋白的稳定表达相比，更多时候保证目标蛋白的可溶性表达，是建立表达条件的主要工作。很多外源基因在大肠杆菌表达时很容易形成不可溶的包涵体，其原因可能有：表达量过高，研究发现在低表达时很少形成包涵体，表达量越高越容易形成包涵体；蛋白合成速度太快，以至于没有足够的时间进行折叠，二硫键不能正确配对；过多蛋白间的非特异性结合，蛋白质无法达到足够的溶解度等。目前对包涵体的形成和复性过程中发生聚集的机制尚不清楚，但已经报道了很多用于优化表达以增加目标蛋白可溶性的方法。

8.2.1 确定表达状况

转化构建好的质粒至表达宿主感受细胞，挑取单克隆子至 5ml 含有相应抗性的 LB 培养基中，37℃，200 rpm，培养至 OD₆₀₀=0.5 左右，加入 IPTG 至终浓度 0.2mM，转移至 28℃，200 rpm 继续诱导培养，可以在 2h，4h，6h 分别取样以分析表达状况。

将取出的 1ml 菌液 12000 rpm 离心 1min，收集菌体，加入 1ml PBS 缓冲液重悬沉淀，同样离心 1min。再加入 300~500ml PBS 重悬细胞。

超声破碎细胞（具体见操作细胞破碎）

将破碎液体 4℃，12000 rpm 离心 10min，分离上清和沉淀。

SDS-PAGE 分析上清和沉淀的蛋白分布（具体操作参考 SDS-PAGE）。

若在上清中有明显的目的蛋白的条带，即可以放大培养进而纯化目标蛋白。

若目标蛋白的表达主要分布于沉淀，则可以尝试一下几种方法来改善表达。

改变表达载体下手，像 GST，NMS，MBP，TrxA 等融合标签能够提高很多蛋白在大肠杆菌中表达的可溶性，此外一些分泌标签如 ompA，Pet-22b 上的 pelB 也能够将目标蛋白运输至细胞的周质空间，从而提高目标蛋白的可溶性。

降低表达速度，可采取低温诱导，如 15℃ 诱导过夜，或者采用弱启动子表达载体。

尝试一些特殊设计的表达宿主 Origami: thioredoxin reductase/glutathione reductase 双突变适合带 thioredoxin reductase 的融合表达载体，帮助形成更多的二硫键。

对于一些蛋白可能无法实现可溶性表达，这时候溶解包涵体后再纯化是唯一的解决办法。

8.2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）

大肠杆菌表达纯化外源蛋白，SDS-PAGE 是必不可少的操作。可以用来检测蛋白的表达情况（表达量，表达分布等），用来分析纯化的目的蛋白的纯度。本节列出 SDS-PAGE 操作中一些试剂的配置及其基本的操作过程。

8.2.2.1 主要试剂的配置

（1）30%丙烯酰胺贮存液：29g 丙烯酰胺和 1g N,N'-亚甲双丙烯酰胺溶于 100ml 热水中，验证其 pH 值不大于 7.0。置棕色瓶中，4℃ 保存。

丙烯酰胺具有很强的神经毒性并可以通过皮肤吸收，其作用具累积性。称量丙烯酰胺和亚甲双丙烯酰胺时应戴手套和面具。可认为聚丙烯酰胺无毒，但也应谨慎操作，因为它还可能会含有少量未聚合材料。建议实验室划出专门的台面，设置单独的配置器皿进行 SDS-PAGE 的相关实验。

- (2) 1.5mol/L Tris (pH8.8) 溶液。
- (3) 10% SDS 溶液: SDS 10.0g 加入 ddH₂O ToTo100。
- (4) 10%过硫酸铵: 新鲜配制。
- (5) TEMED 溶液: 4℃保存。
- (6) 1.0 mol/L Tris (pH6.8) 溶液。
- (7) 2×样品溶解液: 2%SDS, 5%巯基乙醇, 10%甘油, 0.02%溴酚蓝, 0.01mol/L Tris-HCl (pH8.0) 缓冲液。
- (8) 5×Tris-甘氨酸电极缓冲液: 15.1g Tris, 94g 甘氨酸和 5g SDS 定容到 1000ml (建议每次电泳用新稀释的缓冲液)。
- (9) 考马斯亮蓝 R 染色液: 每 100ml 甲醇、水、冰乙酸混合物 (9:9:2) 中, 溶解 0.25g 考马斯亮蓝 R, 搅拌溶解。
- (10) 脱色液: 10%冰醋酸 (可加如乙醇, 建议不要使用甲醇)。

8.2.2.2 主要操作步骤

1、凝胶制备

- (1) 安装洗涤干净的玻璃板、板条, 并将玻璃板固定在电泳槽中。
- (2) 配制 10%的分离胶 (具体参考表 2): 迅速在两玻璃板间隙中灌注分离胶, 直至剩余的板宽比梳子长度多 1cm。小心在胶上覆盖一薄层异丙醇或水。
- (3) 在分离胶聚合的过程 (可置于 37℃, 约 10min) 中, 配制 5%的积层胶 (参考表格 3)。
- (4) 分离胶聚合完全后, 倒去异丙醇或水, 用滤纸吸干胶面上的残余。
- (5) 灌注积层胶, 立即插入干净的梳子, 避免产生气泡。
- (6) 积层胶聚合完全后, 小心拔出梳子, 拨去封胶用的塑料条, 固定于电泳槽。
- (7) 在上下电泳槽中加入足够的电泳缓冲液。

2、样品的制备

在蛋白溶液中加入等体积的 2×样品溶解液, 混合液在沸水浴中加热 5min, 冷却后即可上样。

3、上样

用微量移液器上样, 每加入一种样品, 上样量根据根据具体的样品浓度确定, 未知浓度一般用 10 微升。

4、电泳

对于一块胶, 在浓缩胶中电流设置在 15~20mA, 当染料进入分离胶后可设置电压至电流约为 25~30mA, 继续电泳直至染料到达离凝胶底部 1cm 处。

5、后处理

- (1) 染色: 加入染色液 (用量同上), 室温染色 30min~1h。
Tip: 染色前可将染色液在微波炉里加热至沸, 然后摇床震荡染色约 10min 即可。
- (2) 脱色: 将染色后的胶块用水洗涤三次去除表面染料, 然后加入脱色液脱色, 其间更换脱色液 3~4 次至条带清晰。
Tip: 10min 快速脱色: 将脱色液置于微波炉煮沸, 更换三次脱色液。

表 2. 配制 SDS-PAGE 不同浓度分离胶的配置

不同体积 (ml) 凝胶液中各成分所需体积 (ml)

Gel%	组成	所需要各成份体积 (ml)					
		5	10	15	20	25	30
6%	水	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9
	30%丙烯酰胺溶液	1	2	3	4	5	6
	1.5mol/LTris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5
	10%SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3
	10%过硫酸氨	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3
	TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024
8%	水	2.3	4.6	6.9	9.3	11.5	13.9
	30%丙烯酰胺溶液	1.3	2.7	4	5.3	6.7	8
	1.5mol/LTris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5
	10%SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3
	10%过硫酸氨	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3
	TEMED	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018
10%	水	1.9	4	5.9	7.9	9.9	11.9
	30%丙烯酰胺溶液	1.7	3.3	5	6.7	8.3	10
	1.5mol/LTris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5
	10%SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3
	10%过硫酸氨	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3
	TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012
12%	水	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9
	30%丙烯酰胺溶液	2	4	6	8	10	12
	1.5mol/LTris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5
	10%SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3
	10%过硫酸氨	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3
	TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012
15%	水	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9
	30%丙烯酰胺溶液	2.5	5	7.5	10	12.5	15
	1.5mol/LTris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5
	10%SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3
	10%过硫酸氨	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3
	TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012

表 3. SDS-PAGE 5%浓缩胶的配置

Gel%	组成	所需要各成份体积 (ml)					
		1	2	3	4	5	6
5%	水	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1
	30%丙烯酰胺溶液	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0
	1.0mol/LTris(pH6.8)	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75
	10%SDS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06
	10%过硫酸氨	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06
	TEMED	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06

8.3 细胞破碎获取蛋白质

大肠杆菌细胞破碎有很多方法，譬如反复冻融法，渗透冲击，超声破碎，压力破碎等。其中超声破碎和压力破碎是我室常用方法。

8.3.1 超声破碎

在建立表达条件过程中，小量制备样品可用小型超声细胞粉碎仪。离心 1.0~1.5ml 诱导后的菌液收集菌体，然后视菌体的量加入 300~500 μ l 的缓冲液重悬细胞，然后置于冰上超声破碎。因很多实验室有自己的小型超声粉碎机，各个操作不尽相同，具体操作参考仪器说明书。常规操作步骤如下（以 100ml 培养液为例）：

（1）100 ml 诱导后的菌液（OD600=1.2 左右），12000 rpm，4℃离心 2min，收集菌体。

（2）加入预冷的缓冲液 50ml，重悬细胞洗涤菌体一次，12000 rpm，4℃离心 2min，收集菌体；常规的操作所使用的缓冲液多为 PBS 或者 Tris-NaCl，针对不同的载体和纯化方法，选择相应的缓冲液。对于一些蛋白酶敏感的目的蛋白，可以在整个操作过程中加入一些蛋白酶抑制剂。

（3）向沉淀中加入 15ml 的缓冲液同上（若菌体太浓，可加倍），充分悬浮，将菌悬液装在一个玻璃小烧杯中，置于冰水混合物中。

（4）破碎：将用缓冲液洗涤过的超声探头伸入到菌液中，不要接触烧杯底部，每处理 30sec 间隔 1min 使菌液冷却，输出强度为 5~6，频率为 60~70%。

（5）分离上清和沉淀：12000 rpm，4℃离心 20min，分离上清和沉淀。

（6）SDS-PAGE 分析蛋白表达情况。

（7）准备纯化蛋白。

超声破碎注意事项与一些小的改进：

（1）破碎完全的判断：超声前菌悬液是浑浊的，超声完全后变的透明、清澈。

（2）如果超声时出现黑色沉淀，说明超声功率太强。

（3）超声时间太长、功率太高对蛋白活性肯定有影响。

（4）尽量防止泡沫的产生。

（5）大量破碎时将菌液置于一玻璃器皿中，破碎时放在冰水混合物中，以增加散热，减小对蛋白的破坏作用。

（6）破碎前的预处理，在破碎前可用溶菌酶（100 μ g/ml）处理破坏细胞壁（10min，30℃），增加细胞的通透性。

8.3.2 压力破碎

高压破碎是大量的破碎提取细胞内成份的首选方法，相对于超声破碎，它具有过程温和，操作迅速等优点，具体使用需要根据具体的仪器使用说明。

FRENCH® PRESS 细胞破碎仪标准操作规程

- (1) 使用前将高压腔、底座、活塞杆在 4℃冰箱中预冷 30min。
- (2) 将三脚固定器置于水平桌面上，将高压腔正放在固定器上；在活塞杆的 O 型环、底座的 O 型环和针形阀的 O 型环上均匀涂上少量凡士林。
- (3) 把活塞杆正向插入高压腔至最大加样线，将整个腔体连同活塞杆一起倒转固定在固定器上。
- (4) 将菌液倒入腔体，最大处理量为 35ml，最小为 5ml。视样品体积，大致估计并调整活塞杆的位置。
- (5) 将针形阀和样品喷射管装配于底座上，针形阀拧到轻轻不能拧动为止，并向反方向稍微松动，保证阀门处于开启状态（注意：务必不能用力拧紧，否则会降低其密封性）。把底座倒扣于腔体上，向上调整活塞杆的位置，直至腔内空气完全排出，流出一滴样品为止，轻轻旋紧针形阀。
- (6) 双手托起整个高压腔组件，翻转至正向位置，将其置于升降台上（事先要确保操作台足够的低，以容的下整个组件），向后推动底座，使底座固定于三个位置校准针之间，并调整腔体使针形阀朝向正面。将固定夹固定于支持杆上，拧紧固定夹上的两个螺丝以固定腔体。将活塞杆上的手柄转至与固定夹垂直的方向。
- (7) 打开电源，将档位手柄转至 HIGH 档，顺时针旋转压力控制阀至 50psi，升降台开始上升，当活塞杆接触上顶台后，继续顺时针旋转压力控制阀，直至压力达到需要的压力（大肠杆菌的破碎压力一半设定为 12000psi，芽孢杆菌设定为 2000psi）。
- (7) 取一冰预冷的离心管（或者将离心管至于冰中）置于样品喷射管出口处，轻轻逆时针转动针形阀，小心控制样品的流出速度，根据破碎程度决定流速（建议在喷射管出口处接一个 1cm 长的透明的塑料管如输液管，通过观察塑料管流出样品的透明度来判断破碎是否完全）。当活塞杆上的安全指示线（Stop Line）降至腔体上表面时，迅速关紧针形阀（不要过紧），旋转档位手柄至 DOWN 位置。待升降台完全下降后，继续降低压力至零，关闭电源。
- (8) 松开固定夹，取出高压腔，重新倒置于三脚固定器上，取出底座。将各部分拆开，彻底清洗。底座及喷射管的内壁要重点冲洗，涂有凡士林处要用洗洁精彻底洗净。

【注意事项】

- (1) 仪器最大承受压力为 4000psi（指示针 2500）。
- (2) 各 O 形环处（包括样高压腔，底座，活塞杆和针形阀）一定要涂凡士林润滑，以降低磨损，防止损伤。
- (3) 压力的升高或降低速度要控制在一定范围内。升高压力前务必保证整个组件固定于升降台上，任何的松动可能导致事故。
- (4) 活塞杆的手柄要与固定夹垂直，否则会发生危险。
- (5) 严禁将出样阀过分拧紧，否则会损坏内部撞针，以不流出液体为准。
- (6) 严禁使活塞杆下至安全线以下，否则会导致活塞杆与底座损坏。
- (7) 使用完毕要将压力控制阀转至压力为零。
- (8) 各部件清洗要彻底，否则底座小孔容易堵死，活塞杆上残留的菌体会在未

洗净的凡士林上滋生。

(9) 长期不用应保存在干燥的环境中，必要时可涂凡士林防止生锈。

(10) 压力腔的空气一定要完全排出，否则当样品完全排出时，造成活塞与压力池底座直接接触，造成损伤，由于压力非常大，有可能导致活塞或压力池底座变形，造成永久性损伤！

(11) 在搬动装好的样品池时，一定要双手，一手扶住住高压腔，一手托住底座，防止底座脱落而造成事故。

(12) O 型环若老化则及时更换。

(13) 操作过程中禁止将液体溅入机箱内部。

(14) 仪器使用过程中出现故障应及时与负责人联系。

8.4 目的蛋白的纯化

8.4.1 His Tag 纯化操作实例

本实验室中所用的表达载体 pET28a (+) 中含有一个编码多聚组氨酸的序列，即 His-Tag，因此会获得带有 His-Tag 的重组目标蛋白。His-Tag 可与金属 Ni^{2+} 离子结合，从而有利于目标蛋白的纯化。加上了 His-Tag 的蛋白在非变性的条件下可用 Ni^{2+} 亲和层析柱纯化。纯化蛋白的原理是：当亲和层析柱负载了 Ni^{2+} 后，可以选择性吸附暴露在蛋白表面具有复杂结构的氨基酸残基（特别是组氨酸残基）。蛋白质中含有的组氨酸越多，与 Ni^{2+} 结合的特异性就越高，则将其洗脱下来会需要更高的咪唑浓度。含有组氨酸标签的目标蛋白与细胞中的总蛋白相比，具有更高的 Ni^{2+} 结合特异性。为了得到具有较高纯度的目标蛋白，必须找到一个合适咪唑浓度的洗脱液（结合缓冲液），在此浓度下非特异性的杂蛋白能从柱上洗脱下来，而与 Ni^{2+} 特异性结合的目标蛋白不会被洗脱。最后用更高咪唑浓度的缓冲液（洗脱缓冲液）将目标蛋白洗脱下来，此时目标蛋白特异性的存在于该咪唑浓度的洗脱液中，从而得到纯化了的的目标蛋白质。

8.4.1.1 重组蛋白的诱导

(1) 载体构建：本实验采用 pET-28a (+) 表达载体，克隆受体菌为 E. coli DH5 α ，表达宿主为 E. coli BL21 (DE3)。具体操作参考基因克隆与转化部分。

(2) 挑一个转化重组质粒的单菌落接种于 LB 液体培养基中（含 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素和），于 37°C 过夜培养。

(3) 取 1ml 过夜培养物，转接于 100ml 含 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 液体培养基中，于 37°C 培养 1.5~2 小时至对数生长期。

(4) 在培养物中加入异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 0.2 mM，按照预先建立的最佳表达条件进行诱导表达。

(5) 1200 rpm，离心 2min，收集菌体。

(6) 弃上清，向沉淀中加入 500ml Starting buffer (20mM 磷酸缓冲液 (Na_2HPO_4 和 NaH_2PO_4)，200mM NaCl，10% 甘油，pH 7.0)，充分悬浮洗涤菌体。

(7) 12000 rpm，离心 2min，收集菌体。

(8) 向沉淀中加入 15ml 的 starting buffer，重悬菌体。

(9) 冰浴条件下超声波处理 3min，每处理 30sec 间隔 1min 使菌液冷却，输出强度为 5~6，频率为 60~70%，处理时以不发生气泡，不过热为准，以菌液变清晰为终止标准。

(10) 12000 rpm， 4°C 离心 20min，将上清移到干净灭过菌的 50ml 离心管。

SDS-PAGE 分析蛋白的表达情况。若目的蛋白分布在上清中，继续进行下面的纯化操作。

8.4.1.2 目标蛋白的体外纯化

(1) 灌制好 Ni^{2+} -NTA 亲和层析柱，用去离子水进行缓慢洗脱，避免在柱床中引入气泡。

(2) 用 10 倍柱床体积的 starting buffer 进行预平衡，上样，将细胞破碎后的上清液注入 Ni^{2+} -NTA 亲和层析柱中。

(3) 用 10 倍 ml 的 starting buffer 进行漂洗，收集滤过液。

(4) 开始用 5 倍柱床体积的含 20 mM 咪唑的 starting buffer 进行洗脱，并对洗脱液进行收集。

(5) 依次用 5 倍柱床体积的含 40 mM, 60 mM, 80 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM 和 500 mM 咪唑的 starting buffer 进行洗脱，分别对洗脱液进行收集。

(6) 通过 SDS-PAGE 检测回收的效果，确定咪唑最合适洗脱浓度。

(7) 从每管收集的滤出液取出 10 μl 的样品，加入 10 μl 的 2X SDS 凝胶加样缓冲液，摇匀。

(8) 沸水浴处理 3min。

(9) 取出样品，将 10 μl 样品全部上样于适当浓度的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶上电泳。

【注意事项】

(1) 样品可贮存于 4℃，以备在聚丙烯酰胺凝胶上加样。

(2) 用考马斯亮蓝或银染液进行染色，检测重组蛋白的纯化程度，并找到咪唑最合适洗脱浓度，也就是纯化蛋白含量最多的一管洗脱液所对应的浓度；并将该纯化出来的蛋白质经过 PD-10 柱子以去掉溶液中的咪唑。

(3) 蛋白质被洗脱完成之后，要及时地清洗柱子，使柱子能重复使用。

(4) 在下次对同一蛋白的纯化过程中，即可根据胶图所显示的一个洗脱液中蛋白浓度的情况来优化整个洗脱过程。

蛋白质溶液的去盐处理（使用 PD-10 去盐柱）

(1) 用 10ml 的 starting buffer 平衡 PD-10 去盐柱。

(2) 上样：往 PD-10 去盐柱中加入 2.5ml 的蛋白质溶液。

(3) 用 10ml 的 starting buffer 去洗 PD-10 去盐柱，开始收集滤出液，每 1ml 收集一管。离心管应该先在冰上预冷。

(4) 电泳检测重组蛋白质的纯化程度。

(5) 具体方法和过程与上面步骤一致。

(6) 选择合适的纯化蛋白样品，加入 1 倍体积的预冷甘油。接着将蛋白质样品置于 -80℃ 保存，以备使用。

【注意】PD-10 去盐柱可以多次反复使用，但是不能使柱子变干，保存时应该用相应的缓冲液浸泡，并且置于 4℃。

图 1：PD-10 去盐柱除去盐离子示意图（载自 Amersham Biosciences 产品说明）

8.4.1.3 His-tag NOTE

(1) 若 His 标签蛋白没有结合，请依次检查：

可能原因 1：样品或者是结合缓冲液不正确。策略：检测 pH 及样品和结合缓冲液的组成。确保在溶液中螯合剂或强还原剂的浓度及咪唑的浓度不是太高。

可能原因 2: 组氨酸的标签没有完全的暴露。策略: 在变性条件下(用 4~8 M 脲, 或 4~6 M 盐酸胍)进行纯化。

可能原因 3: HIS 标签丢失。策略 1: WB 或者 anti-his 的抗体检查 His 是否表达, 上游构建, 改变 his-tag 的位置(C-terminal or N-terminal), 必要时增加 his 个数(常用 6~10 个); 策略 2: 孵育的时间不够, 降低流速和增加孵育的时间; 策略 3: 改变螯合的金属离子, 寻找到最佳的结合金属离子。

(2) 若没有洗脱下来, 请依次检查:

可能原因 1: 洗脱条件太温和(组氨酸标记的蛋白质仍然结合在柱上, 结合力较强)。策略: 用增加咪唑的梯度洗脱或降低 pH 来找出最佳的洗脱条件。

可能原因 2: 降低 PH 的方法洗脱的, 因为若 PH 低于 3.5, 会导致镍离子脱落。策略: 改变洗脱办法, 咪唑竞争性洗脱。

可能原因 3: 蛋白已沉淀在柱上。策略: 减少上样量, 或使用咪唑的线性梯度而不是分步洗脱以降低蛋白的浓度。试用去污剂或改变 NaCl 的浓度, 或在变性条件(去折叠)下洗脱(用 4~8 M 脲, 或 4~6 M 盐酸胍)。

可能原因 4: 非特异性疏水或其他相互反应。策略: 加非离子去污剂到洗脱缓冲液(如, 2%Triton X-100)或增加 NaCl 的浓度。

(3) HIS 标签蛋白洗脱后杂带较多, 什么原因? 如何优化?

高纯度的蛋白是纯化工作者的追求, 但是由于很多天然的蛋白也会带有 HIS, 所以经常会出现 HIS 标签蛋白洗脱后有一些杂带, 可能的原因和优化的方法如下:

可能原因 1: 蛋白酶部分降解了标签蛋白。策略: 请添加蛋白酶抑制剂, (慎用 EDTA)。

可能原因 2: 杂质对镍离子有更高的亲和性。策略 1: 咪唑浓度必须优化, 以确保高纯度(宿主细胞蛋白质的低结合)和高产率(组氨酸标记的目标蛋白质的强结合)之间的最佳平衡。分步或者线性洗脱摸索出最优的咪唑结合和清洗浓度; 在样品中加入与结合缓冲液同样浓度的咪唑; 咪唑的梯度不大(20 个或更多的柱床体积), 可能分离出有相似结合强度的蛋白。策略 2: 筛选最适合的缓冲液条件, NaCl 浓度, PH 的范围都需要进行筛选, 以便决定最适的结合和洗脱条件。对于单一目标蛋白在进行缓冲液筛选时, 将缓冲液、盐、甘油和还原剂设计成几个不同的混合配方。

可能原因 3: 杂质和标签蛋白结合在一起。策略: 在超声破碎细胞之前加入去垢剂或者还原剂; 增加去垢剂的浓度, (2 % Triton X-100 or 2 % Tween 20); 或者在 wash buffer 中增加甘油的浓度(50%)减少非特异性的相互反应; 考虑增加咪唑的浓度或者改变金属离子

可能原因 4: 洗涤不充分。策略: 增加洗涤的次数, 使洗涤充分。

8.4.1.4 NTA 树脂的再生

NTA 树脂在使用若干次数(3~5 次)后, 结合效率有所下降, 可以用以下方法再生, 提高树脂的使用寿命和蛋白质的结合效率。注意: NTA 树脂再生前需要从层析柱下端流干所有溶液, 估计出 NTA 的树脂体积, 按下列次序将再生试剂加到层析柱里, 在等上一再生溶液流干后, 再加下一再生溶解。用户需要自行准备 25%, 50%, 75%, 100% (v/v) 乙醇和去离子水。

NTA 再生步骤:

(1) 从层析柱下端流干所有溶液, 用 2 倍 NTA 树脂体积的 0.2M Acetic Acid/6M guanidine HCl 洗。

(2) 用 2 倍体积的去离子水洗。

- (3) 用 3 倍体积的 2% SDS 洗。
- (4) 用 1 倍体积的 25%乙醇洗。
- (5) 用 1 倍体积的 50%乙醇洗。
- (6) 用 1 倍体积的 75%乙醇洗。
- (7) 用 5 倍体积的 100%乙醇洗。
- (8) 用 1 倍体积的 75%乙醇洗。
- (9) 用 1 倍体积的 50%乙醇洗。
- (10) 用 1 倍体积的 25%乙醇洗。
- (11) 用 1 倍体积的去离子水洗。
- (12) 用 5 倍体积的 0.1M EDTA pH8.0 洗。
- (13) 用 3 倍体积的去离子水洗。
- (14) 如果立即使用，用 5 倍体积的 100mM NiSO₄·6H₂O 洗，再用 10 倍体积的平衡溶液 (NTA-0 buffer 或 G_μNTA-0 buffer) 洗。
- (15) 如果想长期储存，加入 1 倍体积的 20%乙醇，4 度保存，使用前需要执行步骤 14。

8.4.2 GST 亲和标签的纯化

谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST) 是继组氨酸之后的第二个应用最多的重组蛋白标记。GST 融合于目标蛋白的 N 端，可以通过谷胱甘肽-琼脂糖亲和层析进行纯化。由于 GST 对底物还原性谷胱甘肽的亲和力是亚摩尔级的，因此谷胱甘肽固化于琼脂糖形成的亲和层析树脂对 GST 及其融合蛋白的纯化效率很高。用 1ml 的树脂纯化 1L 的大肠杆菌培养物可得到的目的蛋白产率为 0.1~6.0 mg。

GST 亲和纯化融合蛋白主要包括结合，洗涤，洗脱三个步骤，全过程只需要一到两种缓冲液，可以大量纯化，也可以小量的实现快速纯化。非常适合实验室小量制备大肠杆菌重组蛋白。下面以克隆到表达载体 pGEX-6p-1 上的 GFP 表达纯化为例，介绍一种小量快速的纯化方法，供大家参考。蛋白的诱导与样品的制备方法基本同上。

8.4.2.1 GST 亲和标签纯化的使用

(1) 从 4℃冷柜中取出 Glutathione Sepharose 4B (本产品购置 GE 公司，储存于 20%乙醇，树脂的量和 20%乙醇 1:1)，轻柔、充分翻转摇匀树脂悬浊液。

(2) 用宽嘴吸头吸取 1ml 的脂浆，加入到装有 40ml 的 PBS (整个操作过程所有的 PB 均需预冷) V 型离心管中，轻柔颠倒数次，洗涤除去残留的 20%乙醇，2000 rpm，离心 5min，小心倾倒入 PBS。

(3) 将破碎后的上清加入平衡上一步骤中的树脂中，轻轻混匀，4℃振荡温育，500 rpm，1h，期间不断混匀，防止树脂沉淀，保 GST-GFP 充分结合于树脂上。

(4) 2000 rpm，离心 5min，小心倾倒入上清。

(5) 向沉淀中加入约 40ml 的 PBS，轻柔混匀，振荡温育 10 min，2000 rpm，离心 5min，小心倾倒入上清。

(6) 重复步骤 (5) 一次，然后向沉淀中加入 5ml 的 PBS 悬浮树脂，并将悬浮液转移到一个 10ml 的塑料层析柱，并打开阀门放掉 PBS。

(7) 洗脱收集目的蛋白。根据实验需要不同有两种方法来收集目的蛋白。

方法一：是不切除 GST-tag，可以向 (6) 中的树脂中加入 1~2ml 的洗脱缓冲液 (50 mM Tris-HCl, 10 mM 还原性谷胱甘肽 (GSH)，pH 8.0)，轻轻混匀然后 4℃温育 10min，收集流出液，即为 GST-GFP 的纯化产物。

方法二：是纯化不含 GST-tag 的蛋白，按照说明书将蛋白酶 PreScission Protease (GE 公司) 用 PBS 稀释到 1ml，加入到 (6) 中的树脂中，轻轻混匀然后 4℃ 温育 12h，收集流出液，即为 GFP 的纯化产物。

(8) SDS-PAGE 分析纯化的蛋白。可以对操作过程中的每一步取样进行 SDS-PAGE 分析。

8.4.2.2 Glutathione Sepharose 4B 再生

GST•Bind 树脂可以重复使用数次而无需再生。但随着非特异性结合的蛋白的增多和蛋白的聚集，往往会造成流速和结合载量都下降。为了去除结合在树脂上的蛋白，可以用 10 倍体积的 50mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH8.0 洗树脂，接着用 10 倍体积的 100mM 醋酸钠 pH4.5, 0.5M NaCl 再洗一次。其它可以选用做去除污染蛋白的缓冲液还包括：6M 尿素，6M 盐酸胍或低极性溶剂，如 50~70%乙醇或 50%乙二醇。任何上述处理后应该立即用 10 倍柱体积 1X GST Bind/Wash buffer 平衡。树脂可以在 4℃ 下，20%乙醇/80%水中长时间存放。

8.4.2.3 GST 使用过程中可能的问题与对策

(1) 目标蛋白结合效率低

结合条件不对：仔细核对各种溶液、缓冲液的成分和 pH。低于 pH6.5 或高于 pH8 时，融合蛋白与 GST•Bind 树脂会结合不充分。确保树脂在与细胞裂解液结合前经过 pH6.5~8.0 缓冲液（如 1X GST Bind/Wash buffer, PBS）的平衡细胞裂解前加入 DTT 会显著改善某些 GST 融合蛋白与 GSTBind 树脂的结合

GST 融合蛋白被超声打断降解：过度超声会破坏带标签的蛋白而减少其与树脂的结合。采用温和的超声条件或改用其它的破碎方法。

蛋白的折叠问题：GST 标签不能够正确的折叠难以结合 GSH 的底物。

(2) 蛋白难以洗脱

洗脱体积太少：有时需要使用更多的缓冲液洗脱目的蛋白。

洗脱缓冲液不新鲜：10XGST 洗脱缓冲液 -20℃ 下可以稳定存放 6 个月，最多耐受 5 次冻融。每次在临纯化前新鲜配制 1X 洗脱缓冲液

洗脱缓冲液中谷胱甘肽浓度太低：GST•Bind 树脂的还原型谷胱甘肽浓度达到 10mM 就够了。但是洗脱时需要的还原型谷胱甘肽的浓度需要达到 75mM。

(3) 纯化的蛋白杂质很多

表达的蛋白不完整：再遇到一些稀有密码子或者特殊的 RNA 的二级结构时，可能使得目标蛋白截短表达，可采用一些特殊的表达宿主，如 Rosetta 系列。

洗涤体积不够：增加洗脱量。

洗脱条件：可已在洗脱缓冲液中加入一定量的非离子去污剂，如 0.1%的 Triton-100 或 NP-40 等。也可以尝试提高洗脱时 NaCl 的浓度，以降低非特异性的结合。

操作过程中目标蛋白降解：控制操作条件，比如严格 4℃ 操作，缓冲液中加入蛋白酶抑制剂，

超声处理过度：减少超声，避免发泡导致蛋白变性。过度超声还会增加宿主内源蛋白与 GST 融合目的蛋白共纯化

共价共纯化：胶上有些多出来的条带是共纯化的促进蛋白正确折叠的分子伴侣，如：DnaK (70kDa)，DnaJ (37kDa)，GrpE (40kDa)，GroEL (57kDa)，和 GroES (10kDa)，再进行一次纯化可以改善。

8.4.3 MBP 亲和标签的纯化

原理：pMAL™系统是一种高效的蛋白融合表达及纯化系统。pMAL 载体含有编码麦芽糖结合蛋白（Maltose Binding Protein, MBP）的大肠杆菌 malE 基因，其下游的多克隆位点便于目的基因插入，表达 N 端带有 MBP 的融合蛋白。通过“tac”强启动子和 malE 翻译起始信号使克隆基因获得高效表达，并进一步利用 MBP 对麦芽糖的亲性和达到用 Amylose 柱对融合蛋白的一步亲和纯化。

此系统的 pMAL 载体含有 LacZ α 基因，目的基因的插入导致其失活，通过 X-gal 平板可进行蓝白斑筛选。pMAL 载体都含有一段编码蛋白酶识别位点的序列，融合蛋白纯化后，通过 Factor Xa (X)，Enterokinase (E) 或 Geneset™ I (G) 可将目的蛋白与 MBP 切割分离。

pMAL™-c2 系列载体缺失 malE 信号序列，导致融合蛋白在细胞质中表达。

pMAL-p2 系列载体含有 malE 信号序列，它可引导融合蛋白穿过胞质膜，进入周质。所有这些载体都含有一段编码蛋白酶识别位点的序列，融合蛋白纯化后，通过 Factor Xa (X)，Enterokinase (E) 或 Geneset™ I (G) 可将目的蛋白与 MBP 切割分离。

Amylose 树脂预装柱是一亲和基质，用来分离与麦芽糖结合蛋白融合的目的蛋白。

结合容量：每毫升柱床体积可结合 3.0 mg MBP-Paramyosin 融合蛋白。

贮存：本品预膨胀在 20% 的乙醇中，4° C 贮存。

过柱缓冲液：20 mM Tris-HCl, pH7.4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA。

添加剂：1 mM sodium azide; 10 mM β -mercaptoethanol 或 1 mM DTT。

洗脱缓冲液：过柱缓冲液+10 mM 麦芽糖

实验步骤：

(1) 重组质粒的构建，转化，融合蛋白的诱导表达和细胞破碎同上。

(2) 融合蛋白的亲和纯化：

预装柱用 8~12 倍柱床体积的双蒸水冲洗；

预装柱用 9 倍柱床体积过柱缓冲液平衡；

将上述实验步骤三的上清液加入到柱床内，控制流速 0.5~1 ml/min（建议每次上样 2~4ml）。

用 12 倍柱床体积的过柱缓冲液淋洗未结合蛋白，每次用 6ml，共 4 次。

用 4 倍柱床体积的洗脱缓冲液洗脱与 Amylose 树脂结合的 MBP 融合蛋白，控制流速约 0.5~1 ml/min。收集 3~5 管样品洗脱液，收集体积为 1 ml/每管。通常，含目的蛋白的融合蛋白在一个柱床体积内将被洗脱下来，可以通过波长为 280 nm 的紫外吸收光或考马斯亮蓝蛋白检测法进行检测。

SDS-PAGE 检测洗脱样品*。

再生。每次纯化蛋白完毕后，需要及时对 Amylose 树脂进行再生。Amylose 树脂可以采用下述清洗步骤进行再生

水	3 倍柱床体积
0.1% SDS	3 倍柱床体积
水	1 倍柱床体积
过柱缓冲液	3 倍柱床体积

【注意事项】

(1) 每次使用时, 请先打开顶端的帽子再移去底部的帽子, 以避免气泡进入到预装柱内。

(2) 在使用本预装柱时, 请使用经过脱气后的缓冲液, 以避免产生气泡。

(3) 预装柱在每次使用完毕后, 在柱床上方加入 2~4 ml 缓冲液或水, 盖上顶端的帽子后, 随即盖上底部的帽子, 竖立放置于 4℃ 贮存。

(4) 长期贮存时应贮存在含 0.02% 叠氮钠的缓冲液中或 20% 乙醇中, 以避免染菌。

【pMAL 系统的优势】

(1) 75% 的蛋白可获得高效表达, 蛋白产量可达 100 mg/L

(2) 与其他几种常用表达系统研究比较, 与 MBP 融合表达更能提高 E. coli 表达蛋白的可溶性。

(3) 采用麦芽糖温和洗脱: 无去污剂或变性剂对蛋白活性的影响。

(4) 可在细胞质或周质中表达 (pMAL-p2X 载体): 周质表达可提高二硫键的形成, 促进蛋白折叠的形成。

8.5 目的蛋白的后处理

8.5.1 目的蛋白的浓缩

蛋白的浓缩液是蛋白纯化过程中常用的操作, 常用的方法有:

(1) 透析袋浓缩法

利用透析袋浓缩蛋白质溶液是应用最广的一种。将要浓缩的蛋白溶液放入透析袋 (无透析袋可用玻璃纸代替), 结扎, 把高分子 (6 000~12 000) 聚合物如聚乙烯二醇 (碳蜡)、聚乙烯吡咯、烷酮等或蔗糖撒在透析袋外即可。也可将吸水剂配成 30~40% 浓度的溶液, 将装有蛋白液的透析袋放入即可。吸水剂用过后, 可放入温箱中烘干或自然干燥后, 仍可再用。

(2) 冷冻干燥浓缩法

这是浓缩蛋白质的一种较好的办法, 它既使蛋白质不易变性, 又保持蛋白质中固有的成分。它是在冰冻状态下直接升华去除水分。具体做法是将蛋白液在低温下冰冻, 然后移置干燥器内 (干燥器内装有干燥剂, 如 NaOH、CaCl₂ 和硅胶等)。密闭, 迅速抽空, 并维持在抽空状态。数小时后即可获得含有蛋白的干燥粉末。干燥后的蛋白质保存方便, 应用时可配成任意浓度使用。也可采用冻干机进行冷冻干燥。

(3) 超滤膜浓缩法

此法是利用微孔纤维素膜通过高压将水分滤出, 而蛋白质存留于膜上达到浓缩目的。有两种方法进行浓缩: 一种是用醋酸纤维素膜装入高压过滤器内, 在不断搅拌之下过滤。另一种是将蛋白液装入透析袋内置于真空干燥器的通风口上, 负压抽气, 而使袋内液体渗出。

(4) 凝胶浓缩法

选用孔径较小的凝胶, 如 Sephadex G25 或 G50, 将凝胶直接加入蛋白溶液中。根据干胶的吸水量和蛋白液需浓缩的倍数而称取所需的干胶量。放入冰箱内, 凝胶粒子吸水后, 通过离心除去。

8.5.2 蛋白质的定量

定量作为生物实验室的日常工作之一, 具有非常重要的意义。在生物学相关的研

究中,无论是对蛋白质表达谱的定量比较还是蛋白质理化性质的分析,都建立在准确的定量这一基础之上。蛋白质的快速定量方法主要依靠蛋白质本身的发色基团,或与其它显色剂反应产生的紫外吸收来进行定量。目前常用的主要有直接紫外吸收法、Bradford 法和 Lorry 法三种。

(1) 直接紫外吸收法

由于蛋白质中存在着含有共轭双键的酪氨酸和色氨酸,所以任何一个蛋白质都具有 280nm 附近的紫外吸收峰,在此波长范围内,蛋白质溶液的光密度 OD_{280nm} 与其浓度呈正比关系,我们可以对其进行定量。紫外吸收法测定蛋白质含量迅速、简便、不消耗样品,低浓度盐类不干扰测定。因此,已在蛋白质和酶的生化制备中广泛采用,尤其在柱层析分离纯化中,常用 280nm 进行紫外检测,来判断蛋白质吸附或洗脱情况。但该法存在无法弥补的缺陷。首先,对于测定那些与标准蛋白质中酪氨酸和色氨酸含量差异较大的蛋白质,有一定的误差,故该法适于测定与标准蛋白质氨基酸组成相似的蛋白质。其次,若样品中含有嘌呤、嘧啶等吸收紫外光的物质,会出现较大干扰。例如,在制备酶的过程中,层析柱的流出液中有时混杂有核酸,应予以校正。

(2) Bradford 法

目前,实验室一般不采用紫外吸收法,而通常采用改良的 Bradford 法进行测定蛋白质含量。其原理为,蛋白质与染料考马斯亮蓝 G-250 结合,使得染料最大吸收峰从 465nm 变为 595nm,在一定的线性范围内,反应液 595nm 处吸光度的变化量与反应蛋白量成正比,测定 595nm 处吸光度的增加即可进行蛋白定量。测定时一般用牛血清白蛋白作为标准品。该法测定要求样品中不能有能与考马斯亮蓝 G-250 反应显色的去污剂,比如 Triton、NP-400、吐温等。与具体操作可参考相关试剂盒说明书。

(3) Lorry 法

其原理是蛋白质与碱性铜溶液中的 Cu²⁺络和使得肽键伸展,从而使暴露出的酪氨酸和色氨酸在碱性铜条件下与福林试剂反应,产生蓝色,在一定浓度范围内,其颜色的深浅与蛋白质中的酪氨酸和色氨酸的含量成正比,由于各种蛋白质中的酪氨酸和色氨酸的含量各不相同,因此在测定时需使用同种蛋白质作标准。具体操作可参考相关试剂盒说明书。

一般而言,紫外吸收法适合于与色谱柱联用,达到实时监控,然而较不准确。Bradford 法适合于大规模测定样品,但是样品中不能含有太高浓度的去污剂,对样品的要求较高。改良的 Lorry 法不再排斥去污剂,相对的操作就比较复杂。我们需要在试验中按照要求选用不同的定量方法。目前两种常用的定量方法都有相关的试剂盒采用。

8.5.3 蛋白的保存

纯化的蛋白往往需要在一定的保存条件,以保证目标蛋白的稳定,避免活性丧失。

蛋白溶液的保存原则:

- (1) 缓冲液 pH 避免接近蛋白的等电点;
- (2) 根据每次使用的量分装成多管,这样可避免反复冻融;
- (3) 加入稳定剂如甘油,DTT, TritonX-100 等。具体操作根据实验需要和蛋白特性,多数蛋白都可以加入终浓度为 50%的甘油后-80℃保存。