

经验交流

一种抑制 pGEX 载体系统本底表达的方法*

黄蓬 缪时英 王琳芳

(中国医学科学院基础医学研究所 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005)
(中国协和医科大学基础医学院,

摘要 用 pGEX 载体系统体外构建了一种人精子膜蛋白片段 (HSD II) 的重组表达质粒. 未经 IPTG 诱导, 该质粒表达的融合蛋白在 DH5 α 中即有较高的本底表达量. 若将带有 Lac I 基因的 pREP4 质粒与重组表达质粒共转化 DH5 α 菌, 则可有效抑制融合蛋白的本底表达.

关键词 表达, 诱导, Lac I

学科分类号 Q753

大多数带有可诱导启动子的原核表达载体系统都存在不同程度的本底表达 (即系统在没有具备诱导条件的情况下仍有一定程度的表达量). 如果本底表达水平较高, 诱导前后的蛋白质表达量差异太小, 则不易判断重组的外源片段是否得以表达, 给设置阴性实验对照带来不便; 尤其当所表达的蛋白质对宿主菌有毒性时, 较高的本底表达量很可能导致蛋白质无法高效表达, 以致表达量很低 (见 Pharmacia 公司 Bulk and RediPack GST Purification Modules Instructions, 1994).

本文利用 pGEX 载体系统所构建的人精子膜蛋白片段 (HSD II) 的重组表达质粒未经 IPTG 诱导, 在 DH5 α 中重组人精子膜蛋白 (HSD II) - 谷胱甘肽巯基转移酶融合蛋白 (GST-HSD II) 即有显著的高本底表达水平 (表达量比诱导表达时略低). 为抑制本底表达, 我们针对 pGEX 载体系统的特点, 将一个带有 Lac I 基因的 pREP4 质粒同时转化 DH5 α , 有效抑制了本底表达, 而对 IPTG 诱导后的 GST-HSD II 表达量没有影响.

1 材料与方法

1.1 材料

pGEX 载体购自 Pharmacia 公司, DH5 α

菌株购自 BRL 公司, 人精子膜蛋白片段 HSD II-cDNA 由本实验室克隆, pUC19-HSD II 由本实验室构建, pREP4 质粒由购自 DIAGEN 公司的 M15 菌株中提取 (见 DIAGEN GmbH 公司的 QIAexpress Instructions, 1992).

1.2 重组融合蛋白 GST-HSD II 的构建

提取 pUC19-HSD II 质粒, 用 Hinc II 和 Bal I 酶双切, 回收 HSD II-cDNA 酶切片段 (523 bp), 与 Sma I 酶处理的 pGEX-4T-3 质粒 (含氨苄青霉素抗性基因) 经 T4DNA 连接酶连接, 转化入感受态的 DH5 α 中, 氨苄青霉素筛选, 提取质粒, 并用限制性内切酶图谱分析筛选插入方向正确的重组菌 a, 将 pREP4 质粒 (含卡那霉素抗性基因) 转化入重组菌 a 中, 经卡那霉素及氨苄青霉素双抗性筛选得到重组菌 b.

1.3 GST-HSD II 融合蛋白的诱导表达及检测

挑取单克隆重组菌 a 或 b, 5 ml LB 培养基 37℃ 振荡培养过夜, 用相应抗生素筛选, 并同时培养仅含 pGEX 载体的菌体作阳性对照管. 取过夜菌 0.8 ml, 加到 5 ml 新鲜 LB-Amp 培

* 攀登计划经费资助.

收稿日期: 1997-01-28, 修回日期: 1997-05-05

养液中, 培养至 $A_{600} = 0.4 \sim 0.5$ 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L 进行诱导, 同时做一个不加 IPTG 的不诱导对照, 5 h 之后收集菌体, 菌体用凝胶加样缓冲液在 100°C 煮沸 10 min 后, 进行 SDS-PAGE, 分离胶和浓缩胶的浓度分别为 12.5% 和 5%^[1] (同样条件以 BL21 (DE3) 及 JM109 为宿主菌表达)。

2 结果与讨论

电泳凝胶染色后的结果表明单纯转化了 pGEX 重组表达质粒的重组菌 a, 不论是否经 IPTG 诱导, 均在约 5 ku 处出现浓染带, 只是诱导前表达量略低; 而同时转化了 pREP4 的重组菌 b, 其不加 IPTG 的不诱导阴性对照在 5 ku 位置几乎看不到染带, 而经 IPTG 诱导的实验组则在相应位置出现浓染带, 二者反差强烈 (图 1)。

达克隆于 T7 启动子成分之后的 GST-HSD II 融合基因, 但实验结果表达量很低 (未给出图片说明); 还曾用 JM109^[2] (其染色体上含 Lac I^q) 做宿主菌, 表达量较高, 但未诱导时的本底表达也较显著 (未给出图片说明); 而以 DH5 α 做宿主时表达量最高, 未诱导时的本底表达量很明显 (图 1), 曾采用含 2% 葡萄糖培养基来降低 GST-HSD II 的本底表达水平 (见 Pharmacia 公司 Bulk and RediPack GST Purification Modules Instructions, 1994), 这样虽能抑制本底表达, 但因同时显著降低 IPTG 诱导后的融合蛋白表达水平而不足取 (未给出图片说明)。

综上所述, pGEX 载体本身编码的 Lac I^q 及宿主菌本身编码的 Lac I^q 都不能提供足够量的 Lac I 可能是导致高本底表达水平的一个原因, 通过向表达宿主中引入含有 Lac I 基因的质粒 pREP4, 可以有效地提高 Lac I 的浓度, 从而有效抑制本底表达, 且不影响 IPTG 诱导后的蛋白质表达量。上述方法对抑制其他带有 IPTG 可诱导启动子的原核表达载体的高本底表达水平同样具有参考价值。值得一提的是, 为抑制不同外源基因的本底表达, 宿主所需提供的最小 Lac I 浓度看来是有差别的: 事实上, 用 pGEX 载体系统或其他 IPTG 诱导表达的载体系统对不同外源基因进行表达时, 出现很高的本底的情况并不常见, 大部分外源基因的本底表达能被 Lac I^q (由表达质粒自身或宿主菌染色体编码) 有效抑制, 而无需额外引入 Lac I, pGEX-4T-3 本身在 DH5 α 中进行空质粒表达时本底很弱即为一例 (图 1)。本实验中出现的本底表达现象应与所克隆的外源基因片段——人精子膜蛋白片段 (HSD II) 的个性相关。

参 考 文 献

- 1 卢圣栋主编. 现代分子生物学技术. 北京: 高等教育出版社, 1993. 381~ 385
- 2 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 金冬雁等译. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 1992. 913 ~ 918

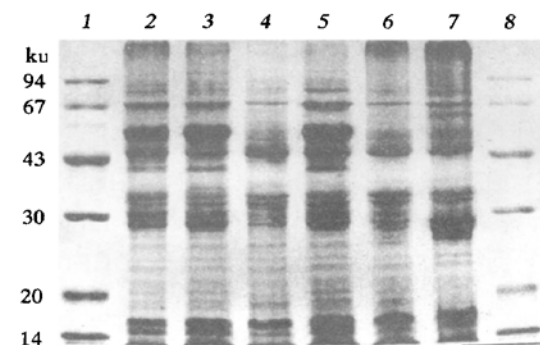


图 1 重组菌 a 和 b 诱导表达的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱比较

1, 8: Pharmacia 的分子质量标准: 94 ku, 67 ku, 43 ku, 30 ku, 20 ku, 14 ku; 2: 重组菌 a (只含重组表达质粒的 DH5 α) 不加 IPTG 诱导的对照; 3: 重组菌 a 加 IPTG 诱导的实验组; 4: 重组菌 b (同时含重组表达质粒和 pREP4 的 DH5 α) 不加 IPTG 诱导的对照; 5: 重组菌 b 加 IPTG 诱导的实验组; 6: 含 pGEX-4T-3 的 DH5 α 不加 IPTG 诱导的空质粒对照; 7: 含 pGEX-4T-3 的 DH5 α 加 IPTG 诱导的空质粒对照。

pGEX 表达载体含 Tac 启动子和 Lac I^q, 我们曾首选 BL21 (DE3)^[2] 做宿主菌, 期望其所编码的 T7 噬菌体 RNA 聚合酶利于高效表

A Method to Inhibit the Basal Level Expression of the pGEX Expression Vectors. HUANG Peng, MIAO Shi-ying, WANG Lir-fang (*National Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China*).

Abstract A recombinant expression plasmid was constructed by inserting the cDNA fragment encoding human sperm membrane protein (HSD II) into pGEX vector. High level expression of the fusion protein was observed in the DH5 α bac-

teria transformed with the recombinant pGEX vector in the absence of IPTG as well as after IPTG induction according to PAGE detection. A simple and valid method was recommended to minimize the basal level expression without IPTG induction: a plasmid pREP4 carrying Lac I gene was cotransformed with the recombinant expression plasmid into DH5 α , and the basal level expression of the fusion protien was inhibited significantly while the presense of pREP4 did not affect overall expression following induction with IPTG.

Key words expression, induction, Lac I

凝胶干板的制作保存与拍摄

聚丙烯酰胺凝胶干板的制作是电泳中常遇到的一个难题，许多学者曾对此进行过研究，其方法各具特色，但效果不甚理想。通常使用GB21°全色胶卷直接拍摄凝胶板，其区带与背景之间反差小。笔者在实验中将聚丙烯酰胺凝胶板微缩后制成干板，方法较为简单，效果也好，现介绍如下：

将凝胶板在自来水中清洗，除去浮色。接着进行三级脱水：一级脱水用2份工业酒精加1份水；二级脱水用3份工业酒精和1份水；三级脱水用95%的酒精，此时凝胶板变为乳白色。根据凝胶板处理的过程不同，干板可分为透明和非透明两种。在一块大小适中的玻璃板上涂抹一层甘油，制作透明干板甘油浓度为70%，非透明干板为90%，铺上玻璃纸，再涂抹甘油，然后将凝胶板铺在玻璃纸上，赶尽气泡（此时拍照为宜）。如果是制作透明干板

需用毛笔蘸少许水均匀涂在凝胶板上（注意不可蘸多，否则凝胶板吸水不均匀）。最后蒙上一层玻璃纸，赶尽气泡，四周用垫条和夹子固定，2天后取下，用透明胶带将干板编号贴于干板下方一角处，可长期保存。

用此法制作的微缩凝胶干板平整、美观、体积小、容易收藏，并且染色区带与背景反差大，便于拍摄出理想的照片。

在拍摄凝胶电泳图谱时，选取涤纶彩色校色滤色片（影星牌，上海影星色光厂生产）置于照相机镜头前，进行校色拍照。一般应按以下原则选取滤色片：红色电泳区带选用绿色或青绿色滤色片；蓝紫色区带选用黄色滤色片；褐色区带选用绿色或青蓝色滤色片。滤色片色彩或深浅不同，可叠加使用。使用滤色片效果优于直接拍摄。

[王莹 河南职业技术师范学院 新乡 453003]