

" 十一五 " 国家重点图书

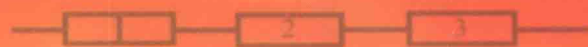
蛋 | 白 | 质 | 科 | 学 | 与 | 技 | 术 | 丛 | 书

蛋白质

高效表达技术

*High Expression Technology
of Protein*

华子春 等编著



G418, FIAU



EII-Cre



LoxP



大肠杆菌表达体系

重组蛋白的分离纯化和复性

酵母表达系统

芽孢杆菌基因表达系统

哺乳动物细胞表达系统

转基因动物表达系统

转基因植物生物反应器



化学工业出版社
生物·医药出版分社

蛋白质

高效表达技术

High Expression Technology
of Proteins

——蛋白质工程与重组蛋白表达——

周从军 周德庆

著

科学出版社

北京·西安·昆明·成都·重庆·长沙·杭州·南京·上海·天津·武汉·珠海

（北京）电话：010-64015000 传真：010-64015080

（上海）电话：021-60709000 传真：021-60709001

（昆明）电话：0871-65336030 传真：0871-65336031

" 十一五 " 国家重点图书

蛋 | 白 | 质 | 科 | 学 | 与 | 技 | 术 | 丛 | 书

蛋白质 高效表达技术

*High Expression Technology
of Protein*

华子春 等编著



化学工业出版社
生物·医药出版分社
· 北 京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

蛋白质高效表达技术/华子春等编著. —北京: 化学工业出版社, 2011. 7

“十一五”国家重点图书

蛋白质科学与技术丛书

ISBN 978-7-122-11673-4

I. 蛋… II. 华… III. 蛋白质-基因表达 IV. Q51

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 129164 号

责任编辑: 傅四周 郎红旗

装帧设计: 关 飞

责任校对: 顾淑云

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 北京永鑫印刷有限责任公司

装 订: 三河市万龙印装有限公司

710mm×1000mm 1/16 印张 9 $\frac{3}{4}$ 字数 173 千字 2011 年 10 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 48.00 元

版权所有 违者必究

丛书序

生命科学在 21 世纪已从基因组的研究进入功能基因组或结构基因组的研究，也就是说要在蛋白质结构的基础上研究基因编码的各种蛋白质的功能，并从传统的单个蛋白质的研究走向细胞内蛋白质群体的研究，从而更加深入地揭示生命活动的奥秘。这方面的工作构成了当今生命科学研究的前沿，即蛋白质科学。

人类对蛋白质重要性的认识源远流长。1878 年恩格斯在《反杜林论》中就指出“生命是蛋白体的存在形式”。不过当时对蛋白质的本质和结构还知之甚少。不久，瑞典的 Theodor Svedberg 利用他首创的超离心技术才知道蛋白质分子是均一的并具有固定的分子量。此后，剑桥大学的 Frederick Sanger 利用纸电泳和纸色谱测出了第一个蛋白质——胰岛素的一级结构；Max Perutz 和 John Kendrew 利用他们首创的重原子同晶置换技术测出了第一个蛋白质——肌红蛋白晶体的三维结构。我国对蛋白质的研究起步也不晚。20 世纪二三十年代，北京协和医学院吴宪领导的实验室对蛋白质的变性作用进行了深入系统的研究，提出蛋白质变性的实质是蛋白质分子从紧密而有序的结构变为散漫而无序的结构。吴宪的蛋白质变性学说对当前蛋白质分子折叠的研究仍然具有现实意义。及至 20 世纪五六十年代，中国科学院生物化学研究所、有机化学研究所和北京大学又通过社会主义大协作合成了胰岛素，而且得到了晶体。这不仅是世界上第一次在实验室合成了具有天然构象的蛋白质，而且彻底证明了“一级结构决定高级结构”这一重要原理。随后，我国又独立测出了胰岛素晶体的三维结构。正是由于国内外这些开创性的工作，才有了当前蛋白质科学的蓬勃发展。

回顾蛋白质科学发展的历程，我们可以看到先进技术对科学发展的无比重要性。除了上述的超离心、色谱、电泳、重原子同晶置换等技术以外，后来涌现的高效液相色谱、二维凝胶电泳、毛细管电泳、质谱、生物芯片等技术又引领了蛋白质组学的研究，使我们有可能对细胞内的大量蛋白质群体进行综合研究。由此看来，科学与技术是相辅相成的，相互促进的，二者缺一不可。

在人类基因组已被基本破译的基础上，成千上万的蛋白质的结构与功能及其相互作用亟待阐明。蛋白质科学的研究成果将有助于阐明生命现象的本质和活动规律，为多种疾病的致病机理和防治提供理论依据。因此，蛋白质科学是发达国家激烈争夺的制高点，成为近年来生命科学不断取得重大突破的热点领域。我国对蛋白质科学也给予了高度重视，《国家中长期科学和技术发展规划纲要（2006—

2020 年)》将“蛋白质研究”列为四项重大科学研究计划之一。在广大科研人员的共同努力下,我国在蛋白质研究领域已开始出现与国际先进水平基本同步的良好发展态势,取得了一些重要的理论和应用成果,陆续在“Nature”、“Science”、“Cell”等重要期刊上发表了一批有影响的论文。

正是在这样的背景下,化学工业出版社及时出版的这套《蛋白质科学与技术丛书》很有现实意义。丛书由相互独立而又彼此联系的各分册组成,主题包括“理论”和“技术”两个层面,现阶段以“技术”为主。归纳起来,这套丛书具有以下一些特色。

1. 选题涉及的范围较为广泛。从蛋白质的基础理论,到研究的各种技术方法,以至于前沿的蛋白质组研究,在丛书中都有体现,以满足不同方向、不同层次的科研和教学需要。

2. 编写队伍具有较高水准,由中国科学院、军事医学科学院、北京大学、南京大学等单位活跃在第一线的学术骨干为主编写。

3. 编写人员分布在国内外各研究机构,因而能扬各家之长,并体现国际化的学术合作。

值得欣慰的是,目前这套丛书已通过立项成为国家“十一五”重点图书出版项目,其编写计划也得到了学术界的大力支持,进展顺利。计划两年内陆续出版的第一批书目包括:

蛋白质物理学概论

蛋白质组学原理

蛋白质电泳技术指南

蛋白质色谱分离技术

蛋白质质谱技术

蛋白质微阵列

蛋白质结构模拟与设计

蛋白质高效表达技术

蛋白质科学的研究方兴未艾,今后的发展任重而道远。面对这一挑战,《蛋白质科学与技术丛书》的出版必将促进我国的蛋白质科学在已有的基础上进一步发扬光大。同时,随着这一领域的飞速发展,也希望这套丛书能不断推出后续的新篇和新人新作。

中国科学院院士

张友尚

2007 年 4 月 26 日

前 言

蛋白质高效表达是从事生物化学、分子生物学、生物技术、生物医药等基础和应用研究的科研人员必须涉及和面对的基本技术问题。不同蛋白质之间由于其性质上的差异，使得不同蛋白质的表达水平和表达难题差异很大，蛋白质高效表达在实际研究工作中成为一个探索性强、个性差异大的研究阶段。本实验室长期从事多肽药物的基因工程和蛋白质工程研究，蛋白质高效表达技术是本实验室常用的技术。本书是应化学工业出版社相关编辑的邀请而撰写的，旨在撰写一本蛋白质高效表达的工具书，将常见的基因高效表达系统及其相关要点和经验进行总结，为从事基因工程的研究人员提供参考和便利，帮助初次进行蛋白质高效表达工作的研究人员缩短其摸索过程。

作者非常感谢化学工业出版社相关编辑的长期支持和鼓励，没有他们的鼓励，本书的出版是不可能完成的。

本书各章编写人员如下。第一章：曹林博士。第二章：马定远博士。第三章：方雷博士。第四章：李淑锋博士。第五章：贾立军博士、刘红旗博士。第六章：徐寒梅博士。第七章：孙启明博士、赵永娟硕士。李淑锋博士参与了全书的校对和整理。

由于本书作者缺乏经验，撰写过程多有周折，书中不妥之处在所难免，恳望读者批评、指正和谅解。

华子春
2011年9月

目 录

第一章 大肠杆菌表达体系	1
第一节 原核表达载体	2
一、pET 载体	4
二、pKK223-3 载体	5
三、IMPACT™ 系统载体和 pMAL™ 系统载体	5
四、pWIN 表达系统	5
五、pGEX 系统	5
第二节 原核表达宿主菌	6
第三节 选择构建载体的策略	8
第四节 重组蛋白的溶解性	8
第五节 增加蛋白质稳定性的策略	9
一、宿主菌选择	10
二、分泌型表达	10
三、包含体	11
第六节 大肠杆菌表达体系的基本操作流程	11
一、基因片段的制备	11
二、载体制备	12
三、载体酶切消化反应和从凝胶进行载体的纯化和回收	12
四、制备插入片段	13
五、将基因片段克隆到表达载体	14
六、筛选阳性克隆、测序分析	16
七、转化表达宿主菌及诱导和优化目的蛋白表达	16
八、培养放大及目的蛋白的纯化	17
第二章 重组蛋白的分离纯化和复性	18
第一节 概述	18
第二节 分离纯化的方法策略及其应用	20
第三节 包含体蛋白质的折叠复性	22

一、蛋白质折叠的过程和机理	24
二、包含体的分离和溶解	25
三、溶解后包含体蛋白质的折叠复性	26
第四节 可溶重组分子的分离纯化	32
一、色谱技术在分离纯化中的应用	33
二、亲和标签在重组蛋白分离纯化中的应用	34
第五节 结语	47

第三章 酵母表达系统

第一节 几种主要酵母表达系统	49
一、酿酒酵母表达系统	49
二、甲醇营养型酵母表达系统	50
三、裂殖酵母表达系统	52
四、乳酸克鲁维亚酵母表达系统	52
五、其他酵母表达系统	52
第二节 酵母表达载体概况	53
一、酵母载体的类型	53
二、酵母载体的基本结构	54
第三节 酵母表达系统的研究方向	55
一、提高外源蛋白在酵母中的表达水平	55
二、提高外源基因表达产物的质量	55
第四节 酵母表达系统的应用和展望	56

第四章 芽孢杆菌基因表达系统

第一节 芽孢杆菌基因表达系统的特点	57
第二节 芽孢杆菌表达载体	58
一、自主复制质粒	58
二、整合质粒	58
三、噬菌体	59
四、转化方法	59
第三节 宿主菌	59
第四节 外源基因在芽孢杆菌中的分泌表达	59
第五节 芽孢杆菌高效表达外源基因的策略及发展方向	60
一、降低芽孢杆菌胞外蛋白酶活性	60
二、提高表达质粒在细胞中的稳定性	60
三、扩大芽孢杆菌宿主/载体表达系统	61

第五章 哺乳动物细胞表达系统	62
第一节 哺乳动物细胞表达载体	65
一、表达载体基本种类与组成元件	65
二、筛选标记基因	66
第二节 常见的生产用细胞表达系统	70
一、CHO 表达系统	70
二、鼠骨髓瘤细胞系	70
三、COS 细胞	71
四、Vero 细胞	71
第三节 大规模哺乳动物细胞培养的新趋势	71
一、抑制细胞凋亡	71
二、可诱导表达	73
三、新的生产工艺	73
第六章 转基因动物表达系统	74
第一节 制作转基因动物常用方法	74
第二节 同源重组介导的基因打靶	76
第三节 组织特异性表达——乳腺表达的调控元件	80
一、乳汁酪蛋白	81
二、乳清酸蛋白	82
三、 β -乳球蛋白基因	83
第四节 显微注射法制备转基因小鼠技术	85
一、注射 DNA 的纯化和定量	85
二、转基因实验用鼠的种类	85
三、超数排卵、受精卵收集和培养	86
四、显微注射	86
五、胚胎移植	87
六、检测	87
第五节 问题与展望	89
第七章 转基因植物生物反应器	91
第一节 引言	91
第二节 转基因植物的原理与方法	93
一、概述	93
二、转基因植物的选择	93
三、农杆菌介导的转基因技术	94

四、病毒载体介导的转基因技术 100

五、直接转化法获得转基因植物 102

第三节 适于重组蛋白表达的植物宿主 105

一、烟草 105

二、谷类和豆类作物 105

三、水果和蔬菜 106

第四节 转基因植物表达重组蛋白研究进展 107

一、转基因植物可食疫苗研究 107

二、转基因植物抗体工程 114

第五节 叶绿体转基因工程 117

一、叶绿体基因组的特征 117

二、叶绿体转化系统的优越性 118

三、外源基因导入叶绿体的方法 119

四、叶绿体中表达外源基因的研究进展 120

五、存在问题与解决策略 120

六、叶绿体遗传转化的前景和展望 122

第六节 转基因植物安全标记基因的使用及抗性基因的剔除 122

一、转基因植物使用的安全标记基因 123

二、转基因植物中抗性基因的剔除 126

三、展望 130

第七节 理性认识转基因植物的安全问题 130

一、转基因植物食品的安全问题 130

二、转基因植物的生态安全问题 132

参考文献 135

第一章

大肠杆菌表达体系

基因表达系统按照基因表达宿主的性质分为原核表达系统和真核表达系统两类，前者主要包括大肠杆菌表达系统、芽孢杆菌表达系统、链霉菌表达系统、蓝藻表达系统等；后者主要包括酵母表达系统、丝状真菌表达系统、昆虫表达系统、哺乳动物细胞表达系统等。不同的表达系统各有特点，有各自的优点，也有各自的不足。选择一种合适的表达系统是开始基因表达工作前的重要步骤。这种选择可以充分体现出研究者的智慧和风格。本章主要介绍大肠杆菌表达系统。

大肠杆菌表达系统是基因工程中应用最早、最广泛、效率很高的经典表达系统。大肠杆菌表达系统的发展历史可追溯到 20 年前，Struhl 等 (1976)、Vapnek 等 (1977) 和 Chang 等 (1978) 分别将酿酒酵母 DNA 片段、粗糙链孢霉 DNA 片段和哺乳动物 cDNA 片段导入大肠杆菌，引起其表型的改变，证明了外源基因在大肠杆菌中可以呈现有功能的活性表达。这些研究作为大肠杆菌表达系统的发展奠定了理论基础。Guarante 等 (1980) 在《Science》杂志上发表了以质粒、乳糖操纵子为基础建立起来的大肠杆菌表达系统，这一发展构成了大肠杆菌系统的雏形。随着 20 世纪 80 年代后期分子生物学技术的不断发展，大肠杆菌表达系统也不断得到发展和完善。与其他表达系统相比，其优点是培养简单、培养周期短、成本低，且有清楚的遗传背景，目的基因表达水平高，有很强的抗污染能力。尽管后来开发了其他表达系统，但该系统仍然显示出独特的优点，仍是目前广泛使用的一个重要的表达系统。

在基因克隆的研究工作中，人们的主要兴趣往往不在目的基因本身，而是其编码的蛋白质产物，特别是那些商业上、医疗上以及科研工作中具有重要意义的蛋白质。最为快速简便的一种方法就是将这些蛋白质的基因克隆到特定表达载体中，置于大肠杆菌的转录-翻译信号控制之下，在大肠杆菌中

表达出相应的蛋白质。大肠杆菌表达系统主要包括表达载体和宿主菌。典型的表达载体是质粒。大肠杆菌质粒是一类独立于染色体外自主复制的双链、闭环 DNA 分子，大肠杆菌质粒可分为结合转移型和非结合转移型两种，非结合转移型质粒在通常培养条件下不在宿主间转移，整合到染色体上的频率也很低，具有遗传学上的稳定性和安全性。又因其大小一般在 2~50kb 范围内，适合于制备和重组 DNA 的体外操作，因此几乎所有的大肠杆菌表达系统都选用非结合转移型质粒作为运载外源基因的载体，这些表达载体通过对天然质粒的改造获得。理想的大肠杆菌表达载体要求具有以下特征：①稳定的遗传复制、传代能力，在无选择压力下能存在于大肠杆菌细胞内。②具有显性的转化筛选标记。③启动子的转录是可以调控的，抑制时本底转录水平较低。④启动子的转录的 mRNA 能够在适当的位置终止，转录过程不影响表达载体的复制。⑤具备适用于外源基因插入的多克隆位点。复制子、筛选标记、启动子、终止子和核糖体结合位点是构成表达载体的最基本元件。宿主菌包括一套合适的转录翻译工具。其他影响因素还包括密码子的偏爱性以及 mRNA 稳定性等。一个完整的大肠杆菌表达系统至少要有表达载体和宿主菌两部分构成。为了改善表达系统的性能和对各类外源基因的适应能力，表达系统有时还需要有特定功能基因的质粒或溶源化噬菌体参与。到目前为止已经成功发展了许多表达载体和相应的宿主菌。下面将对大肠杆菌表达系统做一些基本的介绍。

第一节 原核表达载体

外源蛋白在大肠杆菌中能够高效表达，主要取决于好的表达载体。好的表达载体一般采用强的启动子和终止子，以及合适的 SD 序列。其中最关键的是启动子，目前常用的大肠杆菌表达系统常采用 Lac、Trp、Tac、T7、P_L 或 P_R 等启动子。下面一一举例说明。

Lac 启动子：Lac 是中等强度的启动子，此表达系统最早建立，研究也最为详细。它是以前大肠杆菌的乳糖操纵子为基础构建。大肠杆菌的 Lac 操纵子为多顺反子结构，它包括阻遏基因 Lac I、启动子 Lac P、操纵基因 Lac O，以及结构基因 Lac Z、Lac Y、Lac A。它同时受到分解代谢产物 CAP 和 cAMP 的正调节和阻遏蛋白的负调节。具体机制是：在缺乏乳糖的条件下，Lac I 基因的产物阻遏蛋白会与启动子结合，使之关闭；而在有乳糖或者 IPTG（异丙基-β-硫代半乳糖苷）、TMG（硫甲基半乳糖苷）、ONPG（邻硝基苯基半乳糖苷）等条件下，这些物质将会与阻遏蛋白结合从而使之不能与启动子结合，CAP、cAMP 形成复合物与启动子 DNA 结合，激发转录过

程。Lac UV5 是一个突变体，可以在没有 CAP 的情况下正常转录，因此只受到 Lac I 蛋白的调控，比一般的 Lac 启动子更易掌控。另外，在实际操作中，一般载体都不表达 Lac I，而是选用可以编码 Lac I 的 F' 菌株作为受体菌株。

Trp 启动子：它是以大肠杆菌色氨酸操纵子结构为基础构建的，包括启动子、操纵基因、弱化子以及 5 个编码色氨酸合成酶的结构基因。其调控机制是：在缺乏 Trp 的情况下，阻遏蛋白前体无法结合启动子，转录正常；而在 Trp 水平较高的情况下，Trp 激活阻遏蛋白使之结合启动子，转录受到抑制。另外，转录还受到弱化子的调节：在高水平 Trp 条件下，弱化子的存在将导致只有部分前导序列被转录，而在低水平 Trp 条件下，尽管有弱化子的存在，仍可全程转录。该启动子的蛋白表达水平高于 Lac 启动子表达系统。

Tac 启动子：这是一种杂合启动子，由 Trp 启动子和 Lac UV5 启动子拼接而成，表现出杂合优势，其表达水平比 Lac 和 Trp 载体系统都要高，是强启动子。Tac I、Tac II、Tac III 是由 Trp 启动子的 -35 区域分别与 Lac UV5 启动子的 -20 区域、Lac 操纵基因、Lac -10 区域杂合而成。其调控机制与 Lac 相似，受 Lac 阻遏蛋白抑制。此类表达系统可以用 IPTG 诱导启动。

T7 启动子：T7 启动子表达水平最高，是以大肠杆菌 T7 噬菌体转录元件为基础构建。T7 噬菌体基因 1 所编码的 RNA 聚合酶活性很高，激活 T7 的启动子转录，转录活性和效率远远比大肠杆菌本身的酶和启动子高。T7 RNA 聚合酶合成 mRNA 的速度比大肠杆菌 RNA 聚合酶快 5 倍，并可以转录某些不能被大肠杆菌 RNA 聚合酶有效转录的序列。在细胞中存在 T7 RNA 聚合酶和 T7 噬菌体启动子的情况下，大肠杆菌宿主本身基因的转录竞争不过 T7 噬菌体转录体系。最终受 T7 噬菌体启动子控制的基因的转录能达到很高的水平。根据上述特点，从 20 世纪 80 年代中期就开始有了以 T7 噬菌体基因元件构建的表达载体（Studier 等，1986；Tabor 等，1985）。pET 系列载体（如 pET-3 等）是经典的 T7 噬菌体启动子表达载体。此类表达系统必须包含 T7 噬菌体 RNA 聚合酶和 T7 噬菌体启动子。T7 噬菌体启动子的转录完全依赖于 T7 RNA 聚合酶，因此 T7 RNA 聚合酶的转录调控模式就决定了表达系统的调控方式。噬菌体 DE3 是 λ 噬菌体的衍生株，一段含有 *lac I lac UV5* 启动子和 T7 RNA 聚合酶基因的 DNA 片段被插入其 *int* 基因中，用噬菌体 DE3 的溶源菌，如 BL21 (DE3)、HMS174 (DE3) 等作为表达载体的宿主菌，调控方式为化学信号诱导型，类似于 Lac 表达系统，可以通过在细菌培养基中加入 IPTG 来启动表达。表达毒性基因的一个方法是通过 CE6 噬菌体感染宿主菌获得 T7 RNA 聚合酶。噬菌体 CE6 是

λ 噬菌体含有裂解缺陷突变和温度敏感突变的衍生株，其 T7 RNA 聚合酶基因处于 P_L 启动子控制下。用带有受 λpL 启动子控制的 T7 RNA 聚合酶的 λ CE6 噬菌体侵染宿主细胞，再通过热脉冲诱导方式激发 T7 噬菌体启动子的转录。这种可在需要时才把 T7 RNA 聚合酶导入的方式可以使本底转录降到很低的水平，尤其是用于表达对大肠杆菌宿主有毒性的重组蛋白质。

P_L 和 P_R 启动子：以 λ 噬菌体早期转录左向启动子 P_L 和右向启动子 P_R 为基础构建，其活性比 Trp 表达系统高。其调节机制是：由 PE 启动子控制的 cI 基因的表达产物可以抑制 P_L 、 P_R 启动子活性。但 cI 的浓度由多种因素决定，不易控制，一般利用温度敏感突变株 $cI857ts$ 的基因产物来调节 cI 的活性。在 $28\sim 30^\circ\text{C}$ 下，合成的 cI 具有抑制活性从而可以抑制 P_L 和 P_R 启动；而在 42°C 时， cI 蛋白无活性， P_L 和 P_R 可正常启动转录。此类表达系统必须采用含有溶源化 $cI857ts\lambda$ 噬菌体的菌株作为宿主或者将 $cI857ts$ 装到载体上。由于 P_L 和 P_R 表达系统在诱导这一环节上不加入化学诱导剂，成本又低廉，因此最初几个在大肠杆菌中制备的药用重组蛋白质都采用 P_L 或 P_R 表达系统 (Caulcott, et al, 1986; Derynck, et al, 1980)。这一表达系统也有其本身的缺陷，首先是在热刺激过程中，大肠杆菌热休克蛋白的表达也会被激活，其中一些是蛋白水解酶，有可能降解所表达的重组蛋白。其次是在大体积发酵培养菌体时，通过热平衡交换方式把培养温度从 30°C 提高到 42°C 需要较长的时间，这种缓慢的升温方式影响诱导效果，对重组蛋白的表达量有一定的影响。

一、pET 载体

pET 载体最初由 Studier 及其同事构建，经过 Navagen 公司多年的开发，形成了一系列新的 pET 载体。利用 pET 系列载体，目的蛋白的克隆、检测以及纯化方便容易，其功能非常强大。目的基因被克隆到 pET 质粒载体上，受噬菌体 T7 强转录及（可选择）翻译信号控制；表达由宿主细胞提供的 T7 RNA 聚合酶诱导。T7 RNA 聚合酶机制十分有效，并具有选择性。充分诱导时，几乎所有的细胞资源都用来表达目的蛋白，诱导表达后仅几个小时，目的蛋白通常可占到细胞蛋白的 50% 左右。该系统可以通过降低诱导物的浓度来削弱蛋白质的表达，以提高某些目的蛋白可溶部分的产量。pET Blue 载体代表了新型表达载体，它具备所有广受欢迎的克隆载体的最理想特点和 T7 驱动蛋白表达的完全功能。目的基因以相对于修饰的大肠杆菌 tet 启动子的反义方向插到 $lacZ$ α -肽编码区，因此可进行蓝/白斑筛选。正确定位于目的基因正义方向上游的 T7 转录和翻译信号使表达成为可能。与标准 pET 载体一样，pET Blue 载体通过转化 λ DE3 溶源菌并用 IPTG 诱导或通过 λ CE6 感染原始宿主菌生产目的蛋白。

二、pKK223-3 载体

该载体是由 Brosias 在哈佛大学的 Gilber 实验室构建的。它具有一个强的杂合启动子 Ptac, 由 Trp 启动子的 -35 区、Lac UV5 启动子的 -10 区、操纵基因及 SD 序列组成。在 Lac I 宿主菌中, Tac 启动子在不加 IPTG 诱导的状况下处于阻遏状态。Tac 启动子下游是一个多克隆位点, 方便外源基因的插入。多克隆位点下游包含一个很强的 rrnb 核糖体 RNA 转录终止子, 起到稳定载体的作用。载体其余部分由 pBR322 组成。使用 pKK223-3 质粒转化相应具有 Lac I 的宿主菌时, 可使外源基因获得高水平表达。

三、IMPACT™ 系统载体和 pMAL™ 系统载体

这两个载体是由 NEB 公司在近几年推出的, 它们是一种新型的蛋白融合表达及纯化系统, 表达水平高, 更利于纯化。IMPACT™ 系统采用 Lac I 启动子, 表达的目的蛋白与一种蛋白自剪接元件 [称为“内含肽 (intein)”] 及几丁质结合蛋白形成融合蛋白, 通过利用内含肽的可诱导自我裂解活性, 在几丁质色谱柱上将目的蛋白释放出来, 表达纯化方便快捷、简捷。pMAL™ 系列载体采用 Lac I9 启动子, 包括 pMAL-C2 系列和 pMAL-P2 系列。pMAL-C2 系列载体缺失 Mal E 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 Mal E 信号序列, 可引导融合蛋白穿过胞质膜进入周间质中。

pMAL 系列载体将目的蛋白与 MBP 融合在一起, MBP 一方面有助于目的蛋白的折叠, 增加其可溶性; 另一方面可以与 Amylose 色谱介质结合, 方便蛋白质的纯化。融合蛋白纯化后, 通过蛋白酶 FactorXa (X)、Enterokinase (E) 或 Genenasetm (G) 可将目的蛋白与 MBP 切割分离。

四、pWIN 表达系统

这个载体系统是以 pBR322 为基础构建而来, 它采用 IPPc 脂蛋白基因启动子, 并在其下游串联 Lac UV5 启动子及其操纵序列。同时, 还组装有 Lac I 阻遏蛋白基因, 可以有效地调控目的基因的表达。该载体整合了大肠杆菌中分泌蛋白的基因 *ompA* (外膜蛋白基因) 的编码信号肽序列, 将外源基因插于信号肽之后, 能进行分泌型表达。

五、pGEX 系统

pGEX 系统由 Pharmacia 公司构建, 是使用比较广泛的一种表达系统。该载体具有 Tac 和 Lac 操纵基因, 并且整合了 Lac I 阻遏蛋白基因, 在其 SD 序列下游是 GST (谷胱甘肽-硫-转移酶) 基因, 目的蛋白基因可与之融合表

达。GST 有助于目的蛋白的正确折叠，提高可溶性，目的蛋白与 GST 之间有凝白酶 Thrombin 和 Xa 因子 (Factor Xa) 的酶切位点。纯化后的融合蛋白可通过这两种酶，把 GST 去掉，而得到纯化的、完整的目的蛋白。

第二节 原核表达宿主菌

表达系统的另外一个重要组分就是宿主菌，一般能导入质粒或其他小片段 DNA 并正常表达的菌株均可作为宿主菌。但是由于表达的是外源蛋白质，大肠杆菌缺乏复杂的蛋白质后加工和折叠系统等原因，表达产物有时会活性很低、降解严重，因此必须筛选或者构建合适的表达宿主菌。现在常用的宿主菌为 BL21 (DE3) (T7 噬菌体启动子系统)、HMS174 (T7 噬菌体启动子系统)、M5219 (P_L 启动子系统)、RB791 (Tac/Lac 启动子系统) 等。

带有染色体 T7 RNA 聚合酶基因的宿主菌蛋白质表达水平较高。这些菌株都是噬菌体 DE3 的溶源菌，噬菌体 DE3 是一种衍生噬菌体，带有噬菌体 21 抗性区和 *lac I* 基因，*lac UV5* 启动子，以及 T7 RNA 聚合酶基因。这一区段被插入 *int* 基因，因此阻止了 DE3 在没有辅助噬菌体时整合到染色体上或从染色体切出。一旦形成 DE3 溶源状态，就只有受 IPTG 诱导的 Lac UV5 启动子指导的 T7 RNA 聚合酶基因转录，在溶源培养体系中加入 IPTG 诱导 T7 RNA 聚合酶产生，继而启动质粒上的目的 DNA 开始转录。为了使外源蛋白更加稳定和高效地表达，许多研究人员在此基础上进行了改造，现已经开发出一系列的、优化的表达宿主菌，包括蛋白酶缺陷型表达宿主菌、氨基酸营养缺陷型表达宿主菌、溶解性增强型表达宿主菌、补充稀有密码子型表达宿主菌等特性的 DE3 溶源菌，下面简要说明。

蛋白酶缺陷型：所有 B 型菌株、B834、BL21、BLR、OrigamiTM B、RosettaTM 及 TuneTM 都缺乏降解蛋白的 *lon* 蛋白酶及 *ompT* 外膜蛋白酶。因此，目的蛋白在这些菌株中的稳定性要高于带有这些蛋白酶基因的菌株。其中 BL21 (DE3) 是用得最多的表达菌，BLR(DE3) 是 BL21 *recA* 衍生菌，能稳定某些带有重复序列的目的基因。

TunerTM 及其衍生菌 (OrigamiTM B 和 RosettaTM) 是 BL21 *lac Y1* 删除突变的衍生菌，能够使整个培养体系中的细胞蛋白表达水平受到均一的调节。Lac 透性酶基因 (*lac Y1*) 突变使 IPTG 均一渗透到所有细胞中，以获得浓度依赖性的、均一水平的诱导。通过调节 IPTG 的浓度，表达水平可以从很低调到相当高，可以和 pET 载体配合达到完全诱导。低水平表达则更