



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

生物化学 与分子生物学实验

郝福英 周先碗



高等教育出版社
Higher Education Press



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

生物化学 与分子生物学实验

郝福英 周先碗

010-58581118
400-810-0888
http://www.hep.edu.cn
http://www.hep.com.cn
http://www.landisoo.com
http://www.landisoo.com.cn
http://www.widenedu.com

2009年7月第1版
2009年7月第1次印刷
27.80元



高等教育出版社
Higher Education Press

内容简介

本书分为分子生物学实验及生物化学实验两部分,共设计了24个综合性较强的实验,其中14个分子生物学实验以应用广泛的绿色荧光蛋白基因为主线贯穿,涵盖了分子生物学的基本实验技术,包括原核生物细胞转化,质粒DNA的分离纯化,限制性内切酶对质粒DNA的酶切与琼脂糖凝胶电泳鉴定,重组技术、PCR基因扩增,基因突变技术,蛋白质电泳分离表达蛋白,蛋白质转移技术,蛋白质分离纯化技术等。10个生物化学实验涉及常用的电泳技术、亲和色谱技术和免疫学实验技术。

本书作为普通高等教育“十一五”国家级规划教材,是北京大学多年实验教学改革成果,充分体现了实验内容的综合性,通过学习和训练,学生们在创新性思维和科研动手能力上都会得到很大提高,适合高等院校生命科学类专业本科生和研究生使用。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验/郝福英,周先碗. —北京:

高等教育出版社,2009.7

ISBN 978-7-04-026717-4

I. 生… II. ①郝…②周… III. ①生物化学-实验

②分子生物学-实验 IV. Q5-33 Q7-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2009)第080028号

策划编辑	王莉	责任编辑	薛玥	封面设计	张志奇	责任绘图	尹莉
版式设计	王莹	责任校对	王效珍	责任印制	张泽业		

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100120
总 机 010-58581000

经 销 蓝色畅想图书发行有限公司
印 刷 三河市春园印装有限公司

开 本 787×1092 1/16
印 张 21
字 数 520 000
插 页 3

购书热线 010-58581118
咨询电话 400-810-0598
网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landracom.com>
<http://www.landracom.com.cn>
畅想教育 <http://www.widedu.com>

版 次 2009年7月第1版
印 次 2009年7月第1次印刷
定 价 27.90元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 26717-00

前 言

《生物化学与分子生物学实验》一书是教学改革的成果,书中每个实验之间都有着非常紧密的联系,改变了以前分子生物学实验之间割裂无联系的状况,这样的尝试尚属首次。

根据科学研究的顺序一般情况下首先得到一个有意义的基因;其次是克隆重组此基因;再经鉴定后进行基因表达;后续分离纯化属于生物化学部分,因此本书在编排顺序上将分子生物学实验排在前,生物化学实验排在后,保持学科的完整性和连贯性。

本书以绿色荧光蛋白基因为主线贯穿整个分子生物学实验,绿色荧光蛋白(GFP)由于其发荧光的特性,在细胞学上有着很广泛的应用。一般用于目的蛋白在细胞内的定位。做法是将 GFP 与目标蛋白融合表达,然后用光学显微镜观察荧光。本书中实验将真核细胞载体的绿色荧光蛋白基因在原核细胞中进行克隆与表达,表达产物用眼睛直接观察或者在长波紫外线(485 nm)激发下发出绿色荧光,是教学中基因表达非常简便的标记物和监测方法。书中设计了 14 个都与绿色荧光蛋白基因有关的实验,涵盖了分子生物学的基本实验技术。另外,书中所设计的实验随着实验编排的顺序难度逐渐加大,这样给不同层次,不同要求的学生提供选择的余地。其中有些实验题目能独立成为一个小课题,如果在实验前给定实验题目,要求学生查阅有关资料,阅读有关文献,自己设计实验方案,独立完成实验题目,这样对学生科学研究的思维有很大帮助。在实验讨论部分,编入了学生的感想和对实验的改进意见,这些设计思想和实验方法还有待验证,但是充分调动学生学习积极性将会有益于能力的培养。

生物化学部分编写了常用的电泳技术,亲和色谱技术,免疫学方面的实验技术。其中亲和色谱技术包含胰蛋白酶的分离纯化和酶促动力学的研究。所设计的双向电泳,是当前蛋白质组学重要的不可缺少的实验技术之一。

由于采用了组内协作、组间讨论的实验方式,学生之间不同学科背景的经验得以相互交流,取长补短,扩大了知识面,培养了互相学习合作的精神并且增强了同学间的科研气氛,增强实验的探索性和趣味性。

本书有四方面的特点:

1. 实验题目和实验方法出于科学研究的最新方法,具有前瞻性。
2. 每个实验都是教师们认真研究,思考和反复验证并且有明确的实验结果和数据,实验本身比较成熟,学生经过实验训练可为后续顺利完成本科论文打下基础。
3. 学生所做的实验均属精选出的有特色,综合性很强的实验,从而拓宽了知识面,掌握的技术更加全面,学生今后无论是继续提高或者到国外深造都有较宽的选择余地,实现本科教育与科学研究阶段的研究生教育接轨。
4. 生命科学一贯重视实验教学,重视培养学生掌握实验技术的能力。从国内或国外的毕业

生反馈的信息来看,学生的动手能力的提高,普遍受到国内外用人单位的欢迎。本书的实验内容会在以前的基础上前进一大步,迈上新的台阶。

这本书的出版得到北京大学生命科学学院领导和专家的极大支持和关怀;本书实验内容中的实验材料得到中国预防医学科学院病毒学研究所张智清教授,扬州大学李湘鸣教授,北京大学生命科学学院苏晓东教授的全力支持,在此表示衷心感谢。在编写中参考了各类分子生物学书籍,参考了多家生物工程公司的图表和软件,从而完善了全书内容,在此表示感谢。

本书的实验内容从实验设计、实验选材到实验操作,都经过多次实践和反复证明,有很多内容是本科学生和研究生们辛勤劳动所取得的可靠的科研和教学成果。因此,本书实际上是众多北大学子和老师们辛勤劳作的成果汇编,所有的褒奖都属于现在在海内外工作的老师和同学们。这些学生是:叶欣、郭琴溪、马杏、劳滢、于泉、罗浩、郝兴华、于亮、陈博、王国晓、曹紫娟、陈宇涛、丁炫瑞、牟平、韩亮、刘浩、蒋莹、沈钰、李春雷、李晶晶、张翼、李剑青、陈崇毅、王茜、张四维、许昌、大方等。在此,请允许我们向他们表示由衷的谢意!

不足之处,敬请指教。

编 者

2008年10月7日

目 录

第一部分 分子生物学实验

背景资料	3
实验 1 绿色荧光蛋白(GFP)基因转入原核细胞	11
实验 2 目的基因载体的分离纯化与质量测定	19
实验 3 含绿色荧光蛋白基因载体的酶切与电泳鉴定	25
实验 4 增强型绿色荧光蛋白基因表达载体的构建	33
实验 5 绿色荧光蛋白基因的表达与鉴定	49
实验 6 PCR 体外扩增绿色荧光蛋白基因及其克隆与表达	63
实验 7 红色荧光蛋白、黄色荧光蛋白基因的克隆和在大肠杆菌中的表达	78
实验 8 谷胱甘肽转硫酶-绿色荧光蛋白融合蛋白的基因克隆及其表达	92
实验 9 增强型绿色荧光蛋白的定点突变及表达检测	108
实验 10 携带增强型绿色荧光蛋白报告基因的温度敏感型表达载体的构建、 鉴定和表达量的测定	130
附录 10-1: pBV220 全序列(从 <i>EcoR</i> I 酶切位点第一个 A 开始)	151
附录 10-2: EGFP 基因全序列	153
实验 11 双报告基因系统的构建及初步检测	154
附录 11-1: Luciferase 基因全序列	175
附录 11-2: 萤光素酶检测步骤	176
实验 12 以绿色荧光蛋白(GFP)为报告基因构建重组酵母检测环境中雌二醇的含量	178
实验 13 绿色荧光蛋白的分离、纯化及其鉴定	198
实验 14 谷胱甘肽转硫酶与绿色荧光蛋白融合蛋白的分离、纯化和酶学的测定	216
附录 I	242

第二部分 生物化学实验

电泳技术	255
实验 15 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	256
实验 16 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳	263
实验 17 聚丙烯酰胺凝胶双向电泳	269
亲和色谱技术	276
实验 18 鸡卵黏蛋白的分离纯化	277
实验 19 胰蛋白酶粗提取与活性测定	283
实验 20 亲和色谱分离胰蛋白酶	287

实验 21 胰蛋白酶动力学测定 291

免疫学技术 301

实验 22 抗血清的制备 303

实验 23 抗血清抗体的测定 306

实验 24 酶联免疫吸附测定 313

附录 II 319

第一部分 分子生物学实验

背景资料

一、绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)

(一) GFP 的发现

1962 年,普林斯顿大学的科学家下村脩(Osamu Shimomura)和 Frank Johnson 到华盛顿州做海洋生物取样调查,他们试图在水母 *Aequorea victoria* 身上找出发出生物荧光(bioluminescence)的来源,答案是一个名为 Aequorin 的蛋白质。而在纯化 Aequorin 蛋白质的过程中,他们又发现了一个特别蛋白质(companion protein)。这种蛋白质会在紫外线的照射下,发出高强度绿色荧光,他们依照这个特性,将这个蛋白命名为 green fluorescent protein(GFP)。

Osamu Shimomura 对 GFP 的兴趣集中在其发出荧光的化学和生化机制上,而第一个意识到 GFP 可以作为一种示踪分子(tracer molecule)的人是 Douglas Prasher。蛋白质即使在显微镜下也不容易看到,但如果将 GFP 基因连接到编码某一蛋白的序列后共同表达为融合蛋白,则该目的蛋白在组织中的分布状况因其被激发出荧光而很容易被追踪。Prasher 成功地克隆到了 *Aequorea victoria* 的 GFP 基因并测序,这一成果于 1992 年发表在 *Gene* 上。

序列发表之后,Prasher 将一份 GFP 克隆寄给了 Martin Chalfie,后者和他的同事们将 GFP 基因转入大肠杆菌(*E. coli*),转基因的 *E. coli* 会在蓝光照射下发出绿色荧光 TPD'DPT。对 GFP 的研究再次取得重大突破的是俄国人 Sergey A. Lukyanov,他的研究小组从不发荧光的几种珊瑚虫 T 中克隆到类似 GFP 的六个荧光蛋白;其中的两个蛋白与 GFP 有显著不同的光谱特性,分别发射黄光和红光。这一发现表明,GFP 类似蛋白并不总是在功能上与生物发光有关。文章发表不久,其他小组也从珊瑚虫中克隆到许多 GFP 类似蛋白,这些发射不同颜色荧光蛋白的发现为在同一细胞内用标记多种蛋白以及荧光分子的结构比较分析奠定了基础。

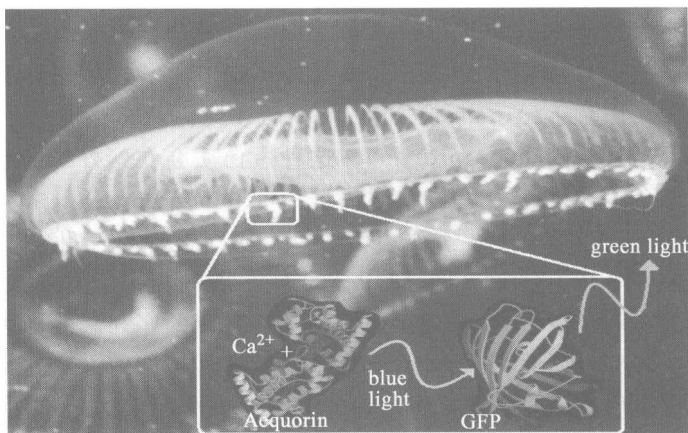
我们今天对 GFP 的发光机制的了解很大一部分应归功于华裔科学家钱永健(T Roger Tsien),他领导的小组培养出了许多 GFP 突变体;与野生型的 GFP 相比,这些突变体有的更快开始发射荧光,有的颜色更强,并且有多种颜色。

瑞典皇家科学院 2008 年 10 月 8 日宣布,3 名科学家获得 2008 年度诺贝尔化学奖,他们是下村脩,马丁·沙尔菲和美籍华裔科学家钱永健。帮助他们获奖的是绿色荧光蛋白。这种蛋白为生物与医学实验带来革命,它发出的荧光像一盏明灯,帮助研究人员照亮生命体在分子层面和细胞层面的诸多反应。

GFP 最初是从多管水母属的 *Aequorea victoria* 中分离得到的。纯化的 GFP 是一个含有 238 个氨基酸残基的蛋白质。其分子较小,相对分子质量约为 27×10^3 。能够吸收蓝光(395 nm 处有最大光吸收)。当受到 Ca^{2+} 或紫外线激活时,发射绿色(或黄绿色)荧光,最大发射峰为 509 nm。Chalfie 等首次报道 GFP 基因在 *E. coli* 中表达成功后,陆续证明 GFP 在哺乳动物、鱼、昆虫、植物、酵母和多种多样的细菌中都能够表达,发出强烈的绿光,被广泛用做原核细胞和

真核细胞的报告基因。

目前已有两个 GFP 有明确的生物特性,其一是水母中分离到的 GFP,其二是海洋珊瑚虫中分离到的 GFP。作为辅助蛋白的 GFP 在水母中的功能是将其所产生的蓝光转换为绿光,这是因为它们之间进行了能量转换的缘故,在低浓度水母发光蛋白和绿色荧光蛋白溶液中,这种能量转换是无法进行的。但是,如果同时将水母发光蛋白和绿色荧光蛋白固定在一个表面上(如 DEAE-Sephadex)或在溶液中使用高浓度绿色荧光蛋白,则可以观测到绿光的产生(背景图 1)。然而,为什么一些绿色荧光蛋白能与某种发光蛋白结合在一起,其机制仍不清楚。水母 GFP 的基因有 720 bp,是由 238 个氨基酸组成的单体蛋白质,相对分子质量约 27×10^3 。



背景图 1 水母中的发光蛋白

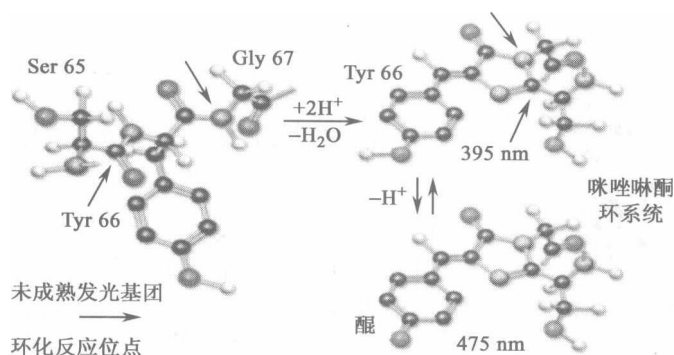
纯化了的 GFP 由 238 个氨基酸组成,相对分子质量约 27×10^3 。激发光主峰 395 nm,还有一小峰 470 nm 处蓝色光波范围。发射绿光:主峰 509 nm,肩峰 540 nm,该绿色荧光十分稳定,无光漂白现象发生。虽然完整蛋白对荧光是需要的,但是当它成为变性蛋白时还呈现同样的光吸收光谱为其特殊之处。绿色荧光蛋白的色基来自主要的氨基酸序列,即丝氨酸-去氢酪氨酸-甘氨酸(serine-dehydrotyrosine-glycine)在六肽(hexapeptide)中的环化,但其形成发色团的机制尚属未知。Chalfie 等(1994 年)为了探讨 GFP 是否还需水母来源的其他因子方可发光,将水母 GFP 的 cDNA 克隆转染异源细胞体系包括原核(大肠杆菌)和真核细胞,当用蓝色光激发时均产生强的绿色荧光。

(二) GFP 结构

GFP 具有独特的化学结构。它的活性荧光生色团(chromophore)是一个三肽,是在分子氧存在的条件下,在翻译后逐渐形成的。生色团的形成不受种属的限制,通过细胞内广泛存在的作用或通过自催化作用都能产生。GFP 的生色团之间是通过共价键结合。荧光生色团非常稳定,变性、用酸、碱处理或者加入盐酸胍会使它失去荧光。但是当 pH 恢复到中性或者移去变性物时,它的荧光又会恢复到变性前的水平。

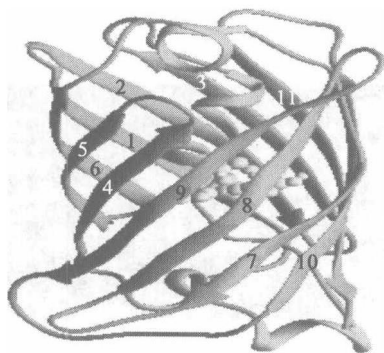
GFP 荧光的产生主要归功于分子内第 65、66、67 位丝氨酸、酪氨酸、甘氨酸形成生色团。翻译出的蛋白质折叠环化之后,在 O_2 存在下,分子内第 67 位甘氨酸的酰胺对第 65 位丝氨酸的羧基的亲核攻击形成第 5 位碳原子咪唑基,第 66 位酪氨酸的 α - β 键脱氢反应之后,导致芳香团与

咪唑基结合。这样,GFP 分子中形成对羟基苯甲酸咪唑环酮生色团,该过程可以自动催化完成。其野生型(wt GFP)的吸收/激发峰在 395 nm,在 475 nm 有一个次要峰(背景图 2)。

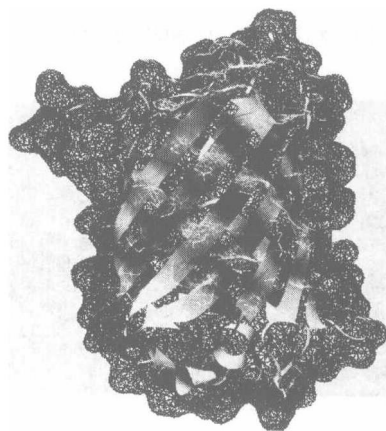


背景图 2 EGFP 绿色荧光蛋白的化学结构

1996 年,GFP 的晶体结构被解出,蛋白质中央是一个圆柱形水桶样结构,长 420 nm,宽 240 nm,由 11 个围绕中心 α 螺旋的反平行 β 折叠组成,荧光基团的形成就是从这个螺旋开始的,桶的顶部由 3 个短的垂直片段覆盖,底部由一个短的垂直片段覆盖,对荧光活性很重要的生色团则位于大空腔内(背景图 3,背景图 4)。GFP 的 cDNA 可译框架长度约 714 bp,编码 238 个氨基酸残基,其肽链内部第 65~67 位丝氨酸-脱氢酪氨酸-甘氨酸通过自身环化和氧化形成一个发光基因,在长紫外波长或蓝光照射下发出绿色荧光。



背景图 3 EGFP 绿色荧光蛋白的晶体结构



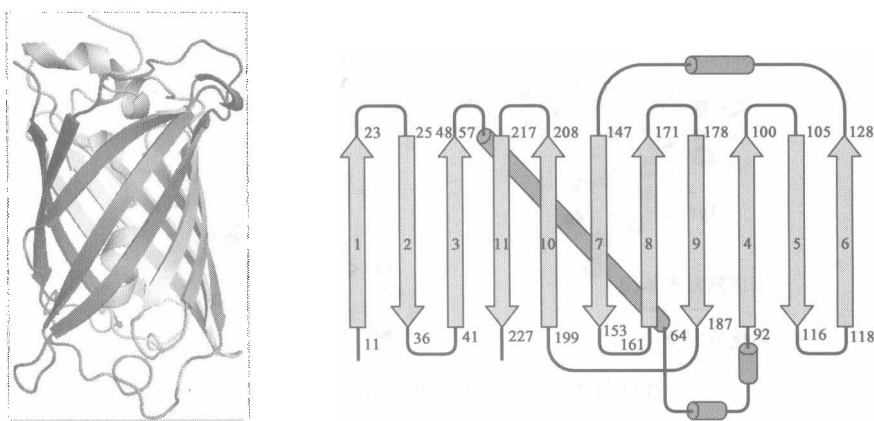
背景图 4 EGFP 绿色荧光蛋白的结构

(三) GFP 的发光机制

当受到紫外线或蓝光激发时,GFP 发射绿色荧光。它产生荧光无需底物或辅因子,发色团是其蛋白质一级序列固有的。GFP 由 3 个外显子组成,长 2.6 kb;GFP 是由 238 个氨基酸所组成的单体蛋白,相对分子质量为 27×10^3 ,其蛋白性质十分稳定,能耐受 60 $^{\circ}\text{C}$ 处理。

1996 年,GFP 的晶体结构被解出,蛋白质中央是一个圆柱形水桶样结构,长 420 nm,宽 240 nm,由 11 个围绕中心 α 螺旋的反向平行 β 折叠组成,荧光基团的形成就是从这个螺旋开始

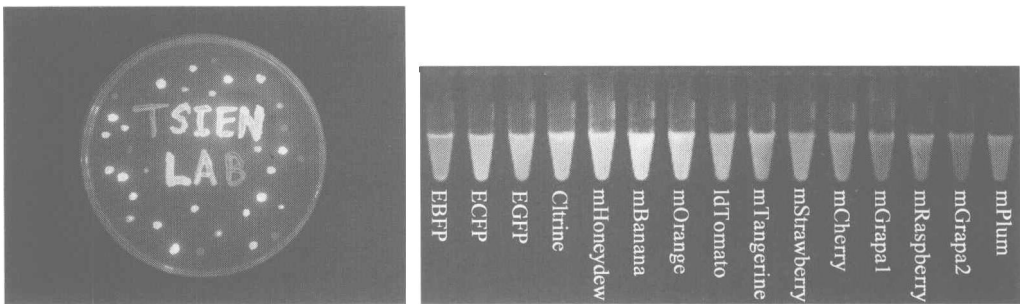
的,桶的顶部由 3 个短的垂直片段覆盖,底部由一个短的垂直片段覆盖,对荧光活性很重要的生色团则位于大空腔内(背景图 5)。



背景图 5 GFP 绿色荧光蛋白的圆柱形水桶样结构

(四) 突变 GFP 可以发出不同颜色的荧光

长期以来人们观察分析细胞多以固定的死细胞为来源进行细胞、亚细胞和分子水平上的结构和功能的研究。然而,20 世纪 90 年代初随着细胞影像技术的出现(尤其是共聚焦显微镜的问世)提供了直接观察活细胞的可能性,可对 GFP 的遗传修饰,包括 GFP 的 cDNA 克隆、点突变、定向打靶等。由于上述分子生物学理论和技术的发展,使得 GFP 成为一种新的活细胞报告分子(背景图 6,彩图),在某种程度上引起了一场新的生物学革命。



背景图 6 经改造的基因发出不同颜色的荧光

(五) GFP 优良特性

上述发现无疑为其后的研究奠定了基础。次年,Brand 报告了 GFP 在果蝇中的表达,Haseloff 和 Chiu 在植物(玉米)中进行研究,同样获得 GFP 高表达的植株。进而,GFP 引起了广大生物科学家们的极大兴趣。有许多种生物都能发光,例如某些细菌、昆虫、腔肠动物,它们能发光与某种蛋白质有关,但是参与的蛋白质和发光机制不太一样。萤火虫发光是其体内萤光素酶氧化萤光素导致的,腔肠动物发光是因为体内有能发光的蛋白质,叫做发光蛋白。能发光的腔肠动物包括水母和珊瑚虫。水母体内有两种发光蛋白,一种是水母素,它在环境中有钙离子时就能发出蓝

光,另一种是绿色荧光蛋白,它吸收了水母素发出的蓝光后,发出波长较长的绿色荧光。人们发现,绿色荧光蛋白的发光并不需要其他因子的参与,只要用紫外线照射就能使之发光,而且绿色荧光蛋白极其稳定,又没有毒性,所以在生物学研究中应用得最多。作为一个报道基因,尤其是活体组织中的报道基因,GFP 具有很多优良特性:

- (1) GFP 的表达与种属无关,不管细胞的种类和位置如何,都能够在细胞内自主表达。
- (2) 其荧光机制是自身含有的,绿色荧光的发射仅需分子氧的存在,而无需其他外源的辅因子。
- (3) GFP 对细胞、组织是无毒的,不扰乱细胞的正常生长和功能。
- (4) GFP 还能克服穿透、毒素、光漂白等不利因素。
- (5) GFP 的荧光可耐受甲醛溶液的固定,因此可制成长期保存的标本。
- (6) 对细胞内 GFP 的检测非常简单,用显微镜、荧光计、荧光激活细胞分选仪等就可以实现等。

(六) GFP 应用研究范畴

综上所述:GFP 的结构和光致荧光非常稳定,而且因 GFP 生色团的形成是自催化的,检测 GFP 的光致荧光不需要外加底物和辅因子,便于活体观察。发光水母的 GFP 应用研究范畴已日趋扩大,主要包括以下 4 个方面:①鉴定转化细胞;②测定体内外基因表达;③标记和定位融合蛋白;④研究细胞内蛋白运输。

GFP 特性由于 GFP 具有以上的特性,被广泛应用于各种生物检测系统:

- (1) 用绿色荧光蛋白作为细胞内肽显示的支架,研究体内蛋白质-蛋白质的相互作用。
- (2) 不稳定的 GFP 突变体用于基因内瞬间表达的研究。
- (3) GFP 作为肌肉特有的标记物,为研究体内肌肉发育提供工具。
- (4) 用 GFP 的荧光动力学快速准确无害地计算细胞的生长速度。
- (5) GFP 可以作为体内宿主-病原体相互作用的标记物。

GFP 蛋白已成为一种示踪完整活细胞生命现象的新途径,也是研究活细胞形态、生理、生化、分子水平变化的新工具。它的产生是各学科相互交叉、渗透的必然结果,相信在不久的将来会涌现出更多的生物发光蛋白,帮助人类进一步探索细胞生命活动。

二、常用的克隆载体

(一) 质粒 pEGFP-N3

1. pEGFP-N3 的来源

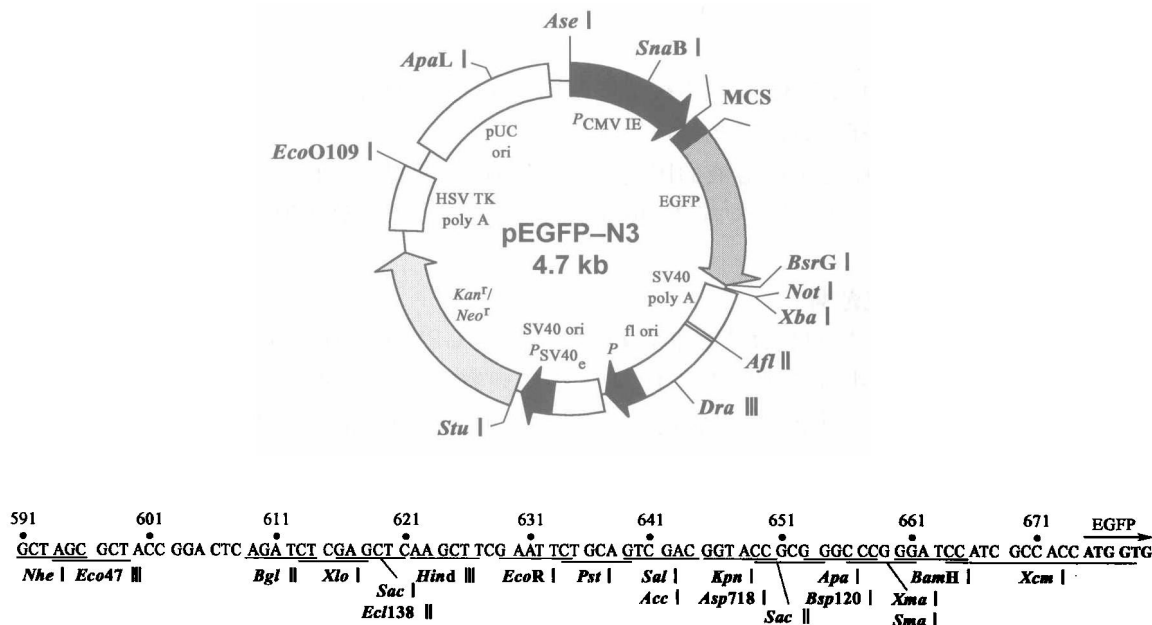
pEGFP-N3 质粒是一个用于在哺乳动物细胞系中表达 EGFP 融合蛋白的质粒,它编码了 EGFP 蛋白,它是野生型绿色荧光蛋白(wtGFP)经克隆技术改造而成的遗传突变体。它有两个氨基酸的替换,即 Phe264→Leu 和 Ser265→Thr。用 485 nm 光激发时,EGFP 可以产生比 wtGFP 强 35 倍的荧光。另外,EGFP 具有红外转换激发光谱(red-shifted excitation spectra),而且能在哺乳动物细胞内得到高水平表达。

pEGFP-N3 质粒编码野生型 GFP 的红移(荧光波长较大)变异体蛋白,具有更强的荧光(在 485 nm 紫外线激发下比野生型强 35 倍)和在哺乳动物细胞中有较好的表达。激发峰在

488 nm, 发射峰在 507 nm。质粒含有卡那抗性基因, “E”表示比野生型更强的荧光。

pEGFP 系列质粒主要用于在目的细胞系中表达 EGFP 蛋白。为保证可译框架的正确性和 EGFP 融合位置的可控性, Clontech 公司在该系列中发展出 C1~C3, N1~N3 等六种不同的质粒, pEGFP-N3 就是其中之一。

2. pEGFP-N3 载体图谱



背景图 7 pEGFP-N3 载体图谱

pCMV:真核启动子,用于质粒在真核细胞中表达蛋白;MCS:多克隆位点,用于插入外源 DNA;EGFP:绿色荧光蛋白基因;HSV TK polyA:单纯疱疹病毒(herpes simplex virus,HSV)胸苷激酶基因标记的多聚腺苷酸保证该质粒可以在真核细胞中稳定遗传的筛选;*Kan^r/Neo^r*:*Kan/Neo* 抗性筛选基因

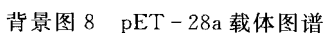
3. pEGFP-N3 质粒介绍

pEGFP-N3 质粒上拥有三个复制起始位点:①pUC ori 用于质粒在原核细胞内的复制;②SV40 ori 用于质粒在真核细胞内的复制;③f1 ori 用于单链 DNA 的生成。质粒采用的筛选标记在原核细胞中是 *Kan* 抗性,在真核细胞中是新霉素抗性。质粒中的 EGFP 基因编码的蛋白具有更强的荧光。

实验使用的 EGFP 蛋白取自原核-真核穿梭质粒 pEGFP-N3 的蛋白质编码序列。此质粒原本被设计于在原核系统中进行扩增,并可在真核哺乳动物细胞中进行表达。本质粒主要包括位于 P_{CMV} 真核启动子与 SV40 真核多聚腺苷酸尾部之间的 EGFP 编码序列与位于 EGFP 上游的多克隆位点;一个由 SV40 早期启动子启动的卡那霉素/新霉素抗性基因,以及上游的细菌启动子可启动在原核系统中的复制与卡那抗性。在 EGFP 编码序列上下游,存在特异的 *Bam*H I 及 *Not* I 限制性内切酶位点,可切下整段 EGFP 编码序列。

(二) pET-28a 表达载体

1. pET-28a 表达载体图谱



2. pET-28a 表达载体介绍

pET-28a 质粒载体具有卡那霉素 (Kan) 抗性, 可通过在含 Kan 的平板上培养筛选到重组菌; 其多克隆位点 (MCS) 内有 *Bam*H I、*Eco*R I、*Xho*I 等限制性酶识别位点, 为插入外源基因提供了便利; 还有受 IPTG 诱导的 *lacI* 启动子, 加入 IPTG 后, 外源基因可以大量表达。

pET-28a 载体的多克隆位点上游有 N 端 his-tag、凝血酶(thrombin)和 T7-tag,下游有一个可选用的 C 端 his-tag。fl 复制原点的放置方向使得转染辅助噬菌体后能够产生对应于编码序列的病毒单链 DNA,从而可以有 T7 终端引物进行单链测序。

pET-28a 具有以下特点:①具有 *T7lac* 启动子,高效及严谨型控制表达水平;②N 端 His Tag/T7 Tag 融合标签,可利用 His Tag 进行金属离子螯合色谱纯化表达蛋白,也可利用 T7 Tag 融合标签进行基于抗体结合的亲和纯化;③含凝血酶蛋白酶切位点;④命名后带有(+)的载体更含有 f1 复制区,可以制备单链 DNA,适合突变及测序等应用。