****

|  |
| --- |
| **原核蛋白（包涵体）表达案例** |



**原核蛋白（包涵体）表达案例**

1. **实验目的**

以客户提供的目的蛋白基因构建表达载体，通过原核蛋白表达体系获得目的蛋白A。

1. **实验设计**

（1）分析客户提供的目的蛋白序列，设计蛋白表达方案；

（2）选择钟鼎特色载体pCzn1，构建表达质粒pCzn1-A；

（3） IPTG诱导进行目的蛋白表达，并且优化表达条件，将诱导条件调整至37℃，经分析目标蛋白主要呈包涵体形式，通过Western Blot检测蛋白A是否表达；

（4）通过Ni柱纯化获得目的蛋白A，SDS-PAGE检测纯化蛋白纯度，BSA方法测定蛋白浓度。

1. **蛋白分析**

（1）经EditSeq翻译目的蛋白A序列：m.w.=23.25kd，pI=5.22

（2）经UniProt匹配，蛋白A物种来源：人类

（3）蛋白性质分析

蛋白亲疏水分析



蛋白跨膜结构域分析



蛋白信号肽预测



分析结果：

目的蛋白整体呈亲水性、无跨膜结构域、无信号肽序列，可尝试全长表达。

结论：将目的基因构建在钟鼎特色载体pCzn1上，利用载体自带信号肽分泌表达。

1. **表达载体构建**
	1. pCzn1-A质粒酶切验证：

 

**酶切鉴定**

Marker: 200,500,800,1200,2000,3000,4500

Line1: 酶切前质粒

Line2: 酶切后质粒

基因名称：A（OD260/OD280:1.82）

酶切位点：NdeI /XhoI

**钟鼎特色载体pCzn1**

4.2 pCzn1-A质粒测序验证：



**部分序列比对结果图**

1. **蛋白表达及纯化**

**蛋白表达鉴定SDS-PAGE分析**

M: 蛋白质分子质量标准

1: 未诱导

2: 诱导后

3: 诱导破碎后上清

4: 诱导破碎后沉淀

**蛋白纯化SDS-PAGE分析**

M: 蛋白质分子质量标准

1: 破碎后处理样品

2: 流出

3: 洗脱



**蛋白Western Blot鉴定分析**

M: 蛋白质分子质量标准

1: 纯化后样品

1. **实验结论**

目的蛋白A在IPTG诱导下进行包涵体形式表达，蛋白表达成功。