

實驗2

原核細胞重組蛋白系統(II) - 蛋白質誘發表現與蛋白質電泳分析

A. 蛋白質誘發表現

I. 目的:

1. 重組質體DNA構築完成後，經細胞轉型與藍白篩選實驗挑選出帶有重組質體DNA的菌株。
2. 抽取重組質體DNA，並將之轉型到具被有表現與製造外源蛋白質的菌株(BL21(DE3))中。
3. 利用IPTG誘導生產大量的外源性蛋白質，再以反覆的冷凍-解凍方法或超音波破碎機打破細胞，以製備重組蛋白質。

II. 實驗流程:

實驗前置備

1. 實驗前一天，每組需挑選藍白篩選實驗中的白色菌落，加入2 ml LB medium (w/ antibiotics)。隔夜培養 (37C shaker, 18-24 hr incubation)。
2. 實驗當天，取回前夜培養之菌液。
3. 根據[TENS protocol](#), 抽取質體DNA並且以分光光度計量測(OD260nm)質體濃度。
4. 取約**50 ng**的質體DNA，轉型到BL21(DE3) *E. coli*中。
5. 隔天需前來檢視並保存成功轉型的LB培養盤，暫置於4C冰箱中。

(本週)

1. 實驗前一天，挑選 BL21(DE3)之轉型菌落，加入 5 ml LB medium (w/ antibiotics)。隔夜培養(37°C shaker; 16hr)。
2. 實驗當天，取 1 ml 之隔夜培養之菌液，加入新鮮的 4 ml LB medium (w/ antibiotics)。
3. 37°C shaker; 150 rpm; 1hr。
4. 標記兩個小離心管(Eppendorf tubes, 1.5 ml) → 0.5hr, 2.5hr。
5. 計算所需要的IPTG體積 (根據 $M1V1 = M2V2$ 方程式計算)。
 - a. 例如: 本實驗使用IPTG之最終濃度為**0.2 mM**，stock IPTG的濃度為0.1M(=100mM)。而每組分配到的菌液體積(在取出1ml uninduced control後)為**5ml**。
 - b. 根據 $M1 \times V1 = M2 \times V2$ 公式可以計算出所需的stock IPTG體積。**(10 ul)**
6. 加入 IPTG 後，將菌液放回 37°C 培養箱，進行 induction。

7. 在 30 min 後取出 1 ml 菌液放入標示 0.5hr 的小離心管內，離心(13000 rpm, 10 min)，吸去上清液後，暫存於冰上。
8. 再 2 小時後依照上述步驟收取 1 ml 菌液。
9. Induction 結束後，將吸去上清液的 pellets 冷凍保存(-20°C)
10. 下次實驗進行 SDS-PAGE 分析。

B. 蛋白質電泳分析

I. 目的

本實驗採用不連續膠體電泳方法 (discontinuous SDS-PAGE)，偵測目標蛋白質之位置。電泳的高解析力使其成為分子生物中有效的分析蛋白質分子量之利器。一般電泳大多以迷你膠片(mini-gel)進行之。膠體材質的種類亦多，但用在蛋白質者則以聚丙烯醯胺(polyacrylamide)為主。在泳動率上，蛋白質的泳動率與其分子量成反比。

II. 實驗步驟

IPTG induction samples 的處理

1. 從冷凍盒取出細菌 pellets，在室溫解凍(可間或輕彈試管底部以加速解凍)。
2. 每管加入 50 ul reducing SDS-sample buffer (內含 2-mercaptoethanol)。
3. 在 Vortexer 上全速 vortex 1-2 min (此步驟極重要!)
4. 放入 90-95C 水浴槽，加熱 10 min。
5. 離心(13,000 rpm; 10 min)。
6. 架妥 SDS-PAGE 之跑膠組。
7. 分別將 0.5-2.5 hr 的檢體加入 2 個連續的孔槽內(10 ul/孔槽)(取上方上清液，切勿取到黏稠的沉澱物!!)。每 4 組共用 1 片膠。
8. 120 volt, 1.5 hr。
9. (在 10F, Rm1020 操作)取下膠片進行染色。加入染劑後放置在震盪台上，15min。染劑需回收使用。
 - (稍後才染色者，可用保鮮膜內加上數滴水之後包覆並存放在 4C 冰箱內)
10. 退染。加入退染劑後放置在震盪台上，約每 30 min 置換一次退染劑，共 3 次(若是退染不佳者，可延長最末一次的退染時間)。退染劑不需回收。
11. 照相存檔。

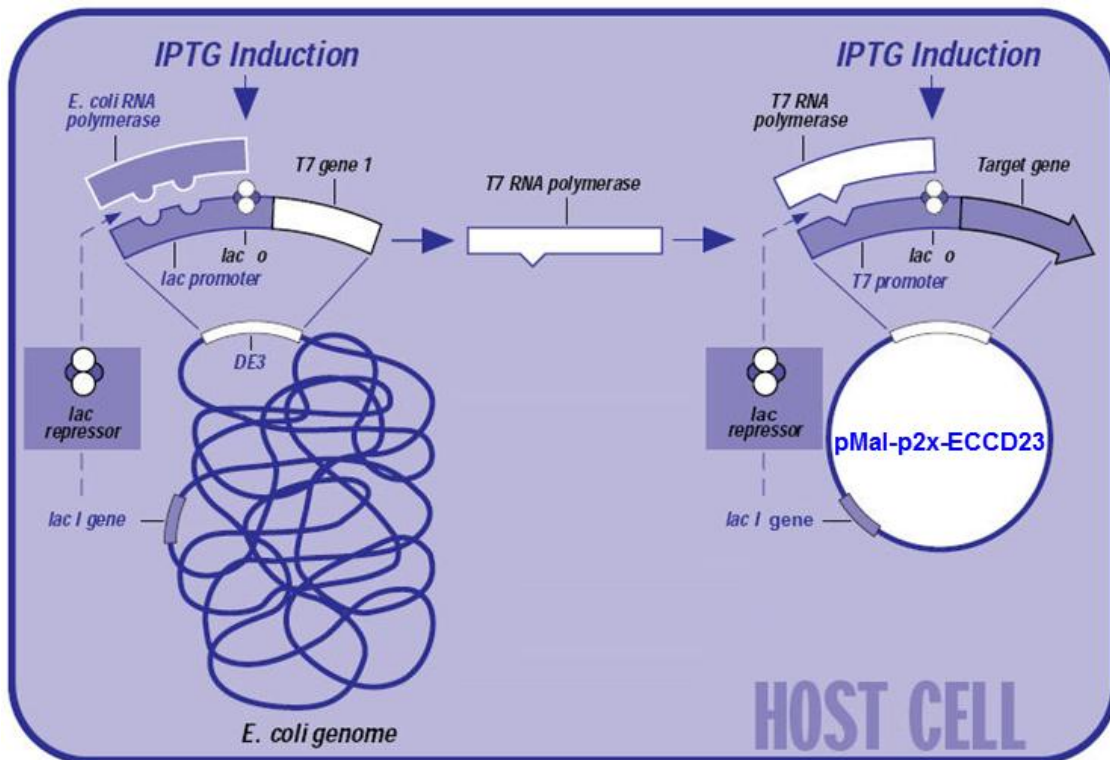
SDS-PAGE 置備 (示範)

蛋白質電泳

1. 做好的 gel 架設在裝置上，倒入 1X SDS running buffer，務必蓋過小片玻璃
2. 將 samples 及 marker 依序加入到玻璃之間的凹槽內，然後蓋上蓋子，電極顏色要一樣
3. (重要!!!)先用低電壓(~80V)，讓 samples 堆積在 stacking layer 和 resolving layer 的交界，之後調高電壓(150V, 35mA, 1.5 hr)，讓 samples 在 resolving layer 分離
4. 將膠片小心取下。

5. 染色約 30min，回收染劑。
6. 退染少量多次(3 次)，每次 20 分鐘，直到清楚看見 signal
7. 照相存檔

Figure 1. Overview of IPTG induction



1. Prokaryotic cells (*E. coli*) DO NOT produce T7 RNA polymerase.
2. Can genetically insert the following genetic elements (called “DE3”) into prokaryotic chromosome:
 - 甲、 the *lac* operator
 - 乙、 the *lac* promoter
 - 丙、 T7 RNA polymerase gene
3. Under normal circumstance, lac I (produced by the *lac I* gene) will bind to the *lac* operator, thereby preventing the DE3 (which harbors the T7 RNA polymerase gene) from being transcribed by *E. coli* RNA polymerase.
4. Addition of IPTG will replace lac repressor from the DE3, allowing production of T7 RNA polymerase from *E. coli* genome.
5. Now, the newly made T7 RNA polymerase can act on the plasmid carrying the recombinant cDNA (e.g. ECCD23) to induce the production of recombinant protein product.

Figure 2. Maps of pMal-p2x plasmid

Features:

lacI: codes for the *lac* repressor protein

lacZα: codes for galactosidase enzyme

polylinker: equivalent to the “multiple cloning sites”

Amp^r: Ampicillin-resistant gene

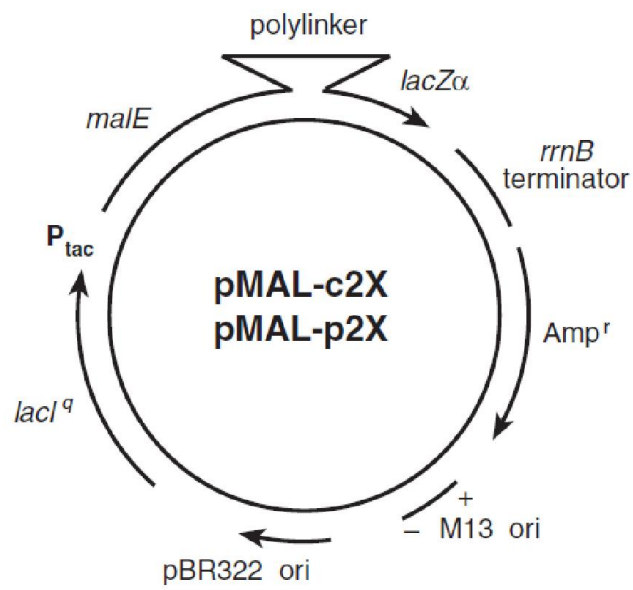


Figure 3. A typical IPTG-induced production of ECCD23 fusion proteins

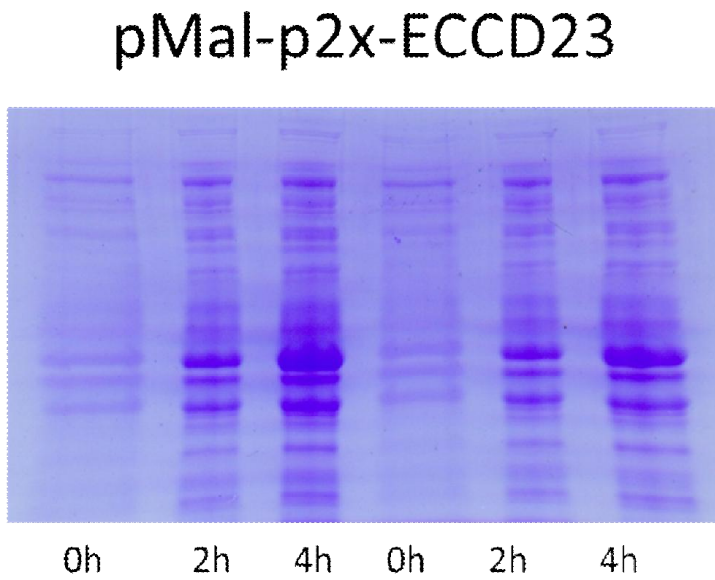
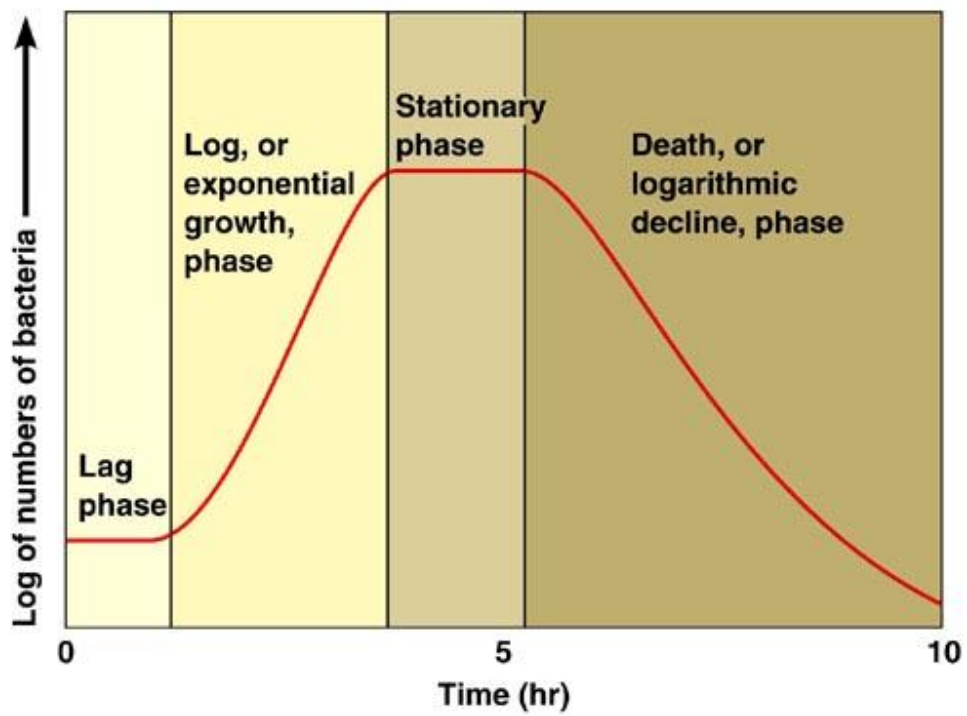


Figure 4. A typical bacterial growth curve



TENS protocol for the Mini-Preps of plasmid DNA

[Procedures]

1. Pellet overnight cultures in microcentrifuge tubes for one minute.
2. Discard supernatant but leave approximately 50 to 100 ul in tube.
3. Add 300 ul of TENS buffer (see below). Vortex.
4. Set on ice for 10 min.
5. Add 150 ul of 3.0 M Sodium Acetate, pH 5.2 and invert.
6. Spin for 10 min.
7. *(Optional) Transfer supernatant to new tube. Extract with 500 µl PCA (Phenol:Chloroform:Iso-amyl alcohol, 25:24:1). Vortex after adding the PCA solution. Spin 13,000 rpm, 10 min.
8. Carefully transfer supernatant to fresh tube containing 0.9 ml of 100% EtOH pre-cooled to -20°C.
9. Spin for 2 min.
10. Discard supernatant. Rinse pellet 1X with 1 ml of 70% EtOH – Spin for 10 min.
11. Discard supernatant. Resuspend pellet with 30 ul of ddH₂O.
12. Determine concentration of the plasmid using spectrophotometer (read OD_{260nm}).

[Materials & Reagents]

3 M Sodium acetate (pH 5.2)	100 ml
10 N NaOH	100 ml
100% EtOH (-20°C)	100 ml
70% EtOH (room temperature)	100 ml
PCA (phenol: chloroform: amyl alcohol=25:24:1)	

TENS buffer

10 mM Tris-HCl, pH 8.0	1 ml of 1 M Tris-HCl, pH 8.0
1 mM EDTA, pH 8.0	200 ul of 0.5 M EDTA, pH 8.0
0.1 N NaOH	1 ml of 10 N NaOH
0.5% SDS	5 ml of 10% SDS
	Add H ₂ O to 100 ml

[Note]

1. (Step #7) The PCA step is optional if the preps are used for restriction digests - however, the plasmid DNA is not likely to be stable over time without PCA extraction due to potential co-purifying DNases.
2. (Step #11) Tris-EDTA (TE) buffer is a better choice for the long-term storage of plasmid DNA at 4C. TE contains EDTA capable of chelating divalent ions (e.g. Mg²⁺) required for the proper function of enzymes (e.g. DNase) detrimental to DNA. But, if the plasmid DNA is meant for the sequencing purpose, then the use of TE buffer MUST BE avoided (use ddH₂O instead).