**酵母蛋白表达案例**

1. **实验目的**

以客户提供的目的蛋白基因构建表达载体，通过酵母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ppic9k，利用Sac I线性化重组质粒ppic9k-A；

（3）电转化毕赤酵母GS115进行蛋白表达，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.=29.07kd，pI=5.72

（2）经UniProt匹配，蛋白A物种来源：\*\*\*\*

 (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ppic9k上，利用载体自带信号肽分泌表达，并在目的蛋白C端添加His标签便于纯化。

1. **表达载体构建**
	1. ppic9k-A质粒酶切验证：

 

**钟鼎特色载体ppic9k**

**酶切鉴定**

Marker: 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000,

2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000, 12000

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：EcoRI/NotI

4.2 ppic9k-A质粒测序验证：



**部分序列比对结果图**

4.3 ppic9k-A质粒线性化分析:

****

M: DNA 标准品从下到上1000,2000,3000,

4000,5000,6000,7000,8000,9000,10000 bp

1: Sac I 酶切

2: 回收目的片段

1. **蛋白表达及纯化**



**蛋白表达鉴定WB分析**

M：蛋白标准品

1: GS115菌株培养72小时上清

2: 6#阳性菌株培养 0小时上清

3: 6#阳性菌株培养24小时上清

4: 6#阳性菌株培养48小时上清

5: 6#阳性菌株培养72小时上清

6: 6#阳性菌株培养96小时上清

7: 6#阳性菌株培养120小时上清

**蛋白表达鉴定WB分析**

M: 蛋白标准品

1: GS115菌株培养72小时上清样品

2: 2#阳性菌株培养48小时上清样品

3: 2#阳性菌株培养72小时上清样品

4: 5#阳性菌株培养48小时上清样品

5: 5#阳性菌株培养72小时上清样品

6: 6#阳性菌株培养48小时上清样品

7: 6#阳性菌株培养72小时上清样品

** **

**蛋白纯化SDS-PAGE分析**

M: 蛋白质分子质量标准

1: 上清浓缩液

2: 流出

3: 洗脱

**蛋白表达鉴定SDS-PAGE分析**

M: 蛋白标准品

1: GS115菌株培养72小时上清

2: 6#阳性菌株培养 0小时上清

3: 6#阳性菌株培养24小时上清

4: 6#阳性菌株培养48小时上清

5: 6#阳性菌株培养72小时上清

6: 6#阳性菌株培养96小时上清

7: 6#阳性菌株培养120小时上清

****

**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**

结合SDS-PAGE和WB结果可以看出，目标蛋白A得到表达，3L发酵液得到0.75mg左右蛋白。