

描述: 本试剂盒所包含的原核表达载体(pCold-SUMO-10His)是在 pCold-SUMO 载体基础上改造而成(HaiGene 专利), 该载体启动子(CS Promoter)来源于南极嗜冷细菌, 在低温下(15 度)才能启动蛋白的表达。低温下细菌生长缓慢, 使得蛋白合成速度减慢, 从而最大限度的提高了蛋白正确折叠的几率, 提高了蛋白可溶性表达, 增强了活性蛋白的表达比率。该表达系统所包含的 SUMO tag 可以极大地提高小分子量蛋白的表达量, 而且进一步提高了蛋白的可溶表达几率。同时, TEE 信号肽可增强冷启动子调控下目的蛋白的高表达。

改进后的 pCold-SUMO-10His 载体, 其 SUMO 蛋白标签含有 10 个组氨酸标签 (10His tag), 使其结合 Ni-NTA 的能力更强。与较早版本的 pCold-SUMO 表达系统相比, pCold-SUMO-10His 表达系统在保留了原有统的蛋白可溶性能生产能力、高特异性剪切能力的情况下, 对 Ni-NTA 结合能力的得到明显提高。其对 Ni-NTA 结合能力的提高, 在以下三个方面改善了生产重组蛋白的性能: (1) 提高了粗蛋白样品中目标蛋白的捕获能力, 从而提高纯化产量; (2) 在蛋白纯化过程中可以使用更高浓度的咪唑进行漂洗, 去杂蛋白的能力明显提升, 从而获得更高纯度的重组蛋白; (3) 在重组蛋白酶切去除 SUMO 标签后, 利用 Ni-NTA 去除 SUMO 标签更为彻底, 获得纯度更高的无标签目标蛋白。

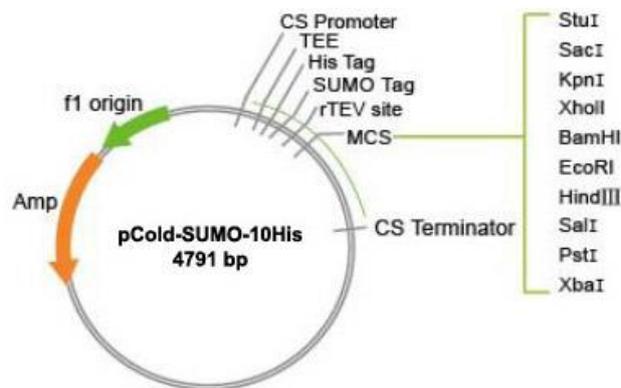
关于宿主菌的使用: 本试剂盒配备了两种宿主表达菌感受态细胞, Lyophilized Arctic (DE3)感受态和 Lyophilized BL21(DE3) Chaprone 感受态, 两种感受态均为冻干品形式可长期保存在-20℃, 效价无明显下降 (2~10X10⁶ cfu/μg)。通常在质粒载体的构建完成, 并测序验证后, 可将重组质粒转入该感受态进行蛋白表达。该宿主菌仅为蛋白表达生产用, 不可以进行载体构建和质粒的提取制备。由于 pCold-SUMO 系统的高可溶性表达特性, 在大多数情况下重组蛋白在 Lyophilized Arctic (DE3)感受态即可获得理想的可溶表达, 因此首次实验请选用 Lyophilized Arctic (DE3)感受态宿主菌。在 Lyophilized Arctic (DE3)感受态宿主菌可溶表达效果不理想的情况下, 再选用操作相对复杂的、带有辅助折叠伴侣分子的 Lyophilized BL21(DE3)Chaprone 宿主菌, 该系统可获得最佳的可溶表达。除此外, pCold-SUMO 系统在常规 BL21(DE3)、BL21(DE3)plys 等宿主菌内均可获得可观的可溶性表达。

关于蛋白酶的使用: 试剂盒配备了 SUMO 蛋白酶 (酵母来源, 也称为 UIP 蛋白酶) 和 rTEV 蛋白酶, 在第一步载体构建过程中需要评估、考虑两个蛋白酶的使用策略。SUMO 蛋白酶识别蛋白结构, 切割活性高、酶切完全, 对于需要去除 Tag 的重组蛋白其是首选。个别情况下 SUMO 标签的结构会受到 C 端重组目标蛋白的影响, 使得 SUMO 蛋白酶对重组融合蛋白的切割效率降低、甚至是无效, 此时再选用 rTEV 蛋白酶进行酶切。由于 rTEV 蛋白酶识别氨基酸序列, 个别重组融合蛋白会包埋识别序列, 因此也会导致蛋白酶切效率下降。由于重组融合蛋白结构的无法预测性, 因此在实验过程中两种蛋白酶的酶切均需要测试。无论如何, 通常 SUMO 蛋白酶具有更高的效率, 是首选。本试剂盒配备的 SUMO 蛋白酶可以识别 SUMO 标签结构 (SDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAFKRQKGEMDSLRFlyDGIRIQADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQIGG) 切割位点位于 QIGG 之后。SUMO 蛋白酶含有双 His 标签, 保证了 SUMO 蛋白酶高亲和力的结合 Ni-NTA, 以最大限度的去除 SUMO 蛋白酶 (分子量约 26kD)。rTEV 蛋白酶可以识别 SUMO 标签后面的 Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly (ENLYFQG)氨基酸序列, 并在识别位点 Gln-Gly(QG)之间进行切割, 从而去除 SUMO 标签。rTEV 蛋白酶含有 6XHis 标签 (分子量约 30kD), 可使用 Ni-NTA 纯化介质去除。

本试剂盒配备的 pCold-SUMO-10His-Positive Plasmid 为蛋白表达阳性质粒, 该质粒含有 43kD 的目标蛋白, 其与 SUMO 标签 (19kD) 融合后分子量约为 62kD。该表达质粒在 Arctic (DE3)中即可获得良好的表达。其可以仅可作为表达、酶切实验的阳性对照品。

组分

名称	数量	保存
pCold-SUMO-10His Vector (100 ng/μl)	50 μl	-20℃
pCold-SUMO-10His-Positive Plasmid (20 ng/μl)	20 μl	
SUMO 蛋白酶(10 U/μl)	100 μl	
10XSUMO Buffer	1 ml	
rTEV Protease (10 U/μl)	100 μl	
20xrTEV Buffer	1 ml	
1700X 氯霉素 (34mg/ml)	1 ml	
200X L-阿拉伯糖 (100mg/ml)	1 ml	
1000X 四环素 (2 μg/ml)	1 ml	
E.coli Transfer Reagent	1.2 ml	
Lyophilized Arctic (DE3)感受态 (10T)	1 瓶	
Lyophilized BL21(DE3)Chaprone 感受态 (10T)	1 瓶	



```

CS Promotor                                     TEE
CGCCATATCGCCGAAAGGCACACTTTAATTATTAAGAGGTAATACACCATG AAT CAC AAA GTG CAT ATG AAT TGG
                                     MET Asn His Lys Val His Met Asn Trp
                                     10xHis Tag
AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA AGC AGC GGC AGC AGC GGC GGT CAT CAC CAT CAT CAT CAC CAT CAT CAC
Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Ser Ser Gly Ser Ser Gly Gly His His His His His His His His His
SUMO Fusion Protein
GGC GGC AGC GGC GGC AGC GGG TCG GAC TCA GAA GTC AAT CAA GAA GCT AAG CCA GAG GTC AAG CCA GAA GTC
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Asp Ser Glu Val Asn Gln Glu Ala Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Val

AAG CCT GAG ACT CAC ATC AAT TTA AAG GTG TCC GAT GGA TCT TCA GAG ATC TTC TTC AAG ATC AAA AAG ACC
Lys Pro Glu Thr His Ile Asn Leu Lys Val Ser Asp Gly Ser Ser Glu Ile Phe Phe Lys Ile Lys Lys Thr

ACT CCT TTA AGA AGG CTG ATG GAA GCG TTC GCT AAA AGA CAG GGT AAG GAA ATG GAC TCC TTA AGA TTC TTG
Thr Pro Leu Arg Arg Leu Met Glu Ala Phe Ala Lys Arg Gln Gly Lys Glu Met Asp Ser Leu Arg Phe Leu
pCOLD-SUMO Primer-F
TAC GAC GGT ATT AGA ATC CAA GCT GAT CAG GCC CCT GAA GAT TTG GAC ATG GAG GAT AAC GAT ATT ATT GAG
Tyr Asp Gly Ile Arg Ile Gln Ala Asp Gln Ala Pro Glu Asp Leu Asp Met Glu Asp Asn Asp Ile Ile Glu
Stu I                                     SacI   KpnI   XhoI   BamHI
GCT CAC CGC GAA CAG ATT GGA GGC CTG GAA AAT CTT TAT TTT CAA GGA GAG CTC GGT ACC CTC GAG GGA TCC
Ala His Arg Glu Gln Ile Gly Gly | Leu Glu Asn Leu Tyr Phe Gln | Gly Glu Leu Gly Thr Leu Glu Gly Ser
SUMO Cleavage Site                       rTEV Cleavage Site
EcoRI HindIII SalI PstI XbaI
GAA TTC AAG CTT GTC GAC CTG CAG TCT AGA TAG GTAATCTCTGCTTAAAAGCAGAAATCTAAGATCCCTGCCATTGGCGGGGA
Glu Phe Lys Leu Val Asp Leu Gln Ser Arg
    
```

操作方法

I. 重组质粒构建

可选用经典的内切酶法对质粒进行双酶切后在 T4 DNA Ligase (货号: D0101) 的作用下进行连接, 或选用 Gibson 无缝克隆试剂盒 (货号: D2601) 法进行载体构建 (不熟悉该试剂盒操作的可联系我处进行设计服务)。无论哪种载体构建策略, 将连接产物转入 DH5 α 等克隆感受态细胞, 通过测序鉴定重组质粒。测序引物 (pCold-SUMO Primer-F: 5'-CCCCTGAAGATTTGGACATG-3'和 pCold-SUMO Primer-R: 5'-TGGCAGGGATCTTAGATTCTG-3')。

II. 重组蛋白表达于 Lyophilized Arctic (DE3) 宿主菌

1. 实验前取出 Lyophilized Arctic (DE3) 感受态细胞放置于冰上, 同时冰上融化 E.coli Transfer Reagent。向每瓶冻干感受态中加入 300 μ l E.coli Transfer Reagent, 并用枪头吹打混合均匀。将溶解后的冻干感受态, 分装到 10 支 0.2ml EP 管中, 每支分装 30 μ l, 并保存到 -80 $^{\circ}$ C。注意: 冻干感受态干粉未溶解的状态下可 -20 $^{\circ}$ C 长期保存, 已经溶解, 务必储存在 -80 $^{\circ}$ C, 可保存 6 个月, 请避免反复冻融。
2. 将重组质粒 (20~100ng) 加入到 30 μ l 上述分装的感受态细胞中, 冰上放置 5min。
3. 42 $^{\circ}$ C 水浴中热激感受态 45s, 立即置于冰上放置 2min。热激完毕后, 将感受态细胞转移到, 装有 450 μ l LB 或 SOC 培养基的 1.5ml EP 管中, 37 $^{\circ}$ C 剧烈振荡培养 1h 后, 涂布于含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的平板上, 过夜培养。
4. 挑选生长良好的菌落, 接入 LB 培养基 (含 40-100 μ g/ml 氨苄青霉素), 37 $^{\circ}$ C 剧烈振荡培养至 OD600=0.4-0.6。
5. 待培养基冷却至 15 $^{\circ}$ C 后, 再静置 30min。
6. 加入适量 IPTG(0.1-1 mM), 15 $^{\circ}$ C 振荡培养 12~24h。
7. 4,000 rpm 室温离心 15min, 收集细胞。
8. 用重悬液重悬细胞, 并置于冰上破碎。
9. 破碎后使用 SDS-PAGE 胶检测蛋白的表达及可溶性表达情况。

III. 重组蛋白表达于 Lyophilized BL21(DE3)Chaprone 宿主菌

1. 实验前取出 Lyophilized BL21(DE3)Chaprone 感受态细胞放置于冰上, 同时冰上融化 E.coli Transfer Reagent。向每瓶冻干感受态中加入 300 μ l E.coli Transfer Reagent, 并用枪头吹打混合均匀。将溶解后的冻干感受态, 分装到 10 支 0.2ml EP 管中, 每支分装 30 μ l, 并保存到 -80 $^{\circ}$ C。注意: 冻干感受态干粉未溶解的状态下可 -20 $^{\circ}$ C 长期保存, 已经溶解, 务必储存在 -80 $^{\circ}$ C, 可保存 6 个月, 请避免反复冻融。
2. 将重组质粒 (20~100ng) 加入到 30 μ l 上述分装的感受态细胞中, 冰上放置 5min。
3. 42 $^{\circ}$ C 水浴中热激感受态 45s, 立即置于冰上放置 2min。热激完毕后, 将感受态细胞转移到, 装有 450 μ l LB 或 SOC 培养基的 1.5ml EP 管中, 37 $^{\circ}$ C 剧烈振荡培养 1h 后, 涂布于含 100 μ g/ml 氨苄青霉素和 20 μ g/ml 氯霉素的平板上, 过夜培养。
4. 挑选生长良好的菌落, 接入 LB 培养基 (含 100 μ g/ml 氨苄青霉素, 20 μ g/ml 氯霉素), 37 $^{\circ}$ C 剧烈振荡培养过夜。
5. 1/50 比例接入新的 LB 培养基 (含 100 μ g/ml 氨苄青霉素, 20 μ g/ml 氯霉素, 0.5mg/ml L-阿拉伯糖) 37 $^{\circ}$ C 剧烈振荡培养 2h (OD600 约 0.3)。
6. 加入终浓度 2ng/ml 四环素, 37 $^{\circ}$ C 剧烈振荡培养至 OD600 约 0.5 (约 2~4h)。
7. 待培养基冷却至 15 $^{\circ}$ C 后, 再静置 30min。
8. 加入适量 IPTG(0.1-1 mM), 15 $^{\circ}$ C 振荡培养 12~24h。
9. 4,000 rpm 室温离心 15min, 收集细胞。
10. 用重悬液重悬细胞, 并置于冰上破碎。
11. 破碎后使用 SDS-PAGE 胶检测蛋白的表达及可溶性表达情况。

IV. 蛋白纯化(SUMO 蛋白酶切)

1.融合 SUMO 标签的重组蛋白含有 10xHis 标签,重组蛋白可通过 Ni-NTA Resin(HaiGene, C0401)进行纯化。详细的纯化操作步骤请参考海基 Ni-NTA Resin(HaiGene, C0401)说明书。

2. 使用 SUMO 蛋白酶切割融合蛋白

(1). 在 EP 管中配制如下反应体系

融合蛋白	50~150 μg
10X SUMO Buffer	20 μl
SUMO 蛋白酶 (10 U/ μl)	2~5 μl
ddH ₂ O	Upto 200 μl

(2). 混匀上述体系后于 30°C 孵育,在 1、2、4、6 小时分别吸出 30 μl 上述反应液,置于单独的 EP 管中。

(3). 向上述 EP 管中加入 20 μl 2xSDS Loading Buffer, 置于-20°C。

(4). 取 30 μl 样品进行 SDA-PAGE 分析。

V. 蛋白纯化(rTEV 蛋白酶切)

1.融合 SUMO 标签的重组蛋白含有 10xHis 标签,重组蛋白可通过 Ni-NTA Resin(HaiGene, C0401)进行纯化。详细的纯化操作步骤请参考海基 Ni-NTA Resin(HaiGene, C0401)说明书。

2. 使用 rTEV 蛋白酶切割融合蛋白

(1). 在 EP 管中配制如下反应体系

融合蛋白	50~100 μg
20xrTEV Buffer	7.5 μl
rTEV Protease	1-3 μl
ddH ₂ O	Up to 150 μl

(2). 30°C孵育,在 1、2、4、6 小时分别吸出 30 μl 上述反应液,置于单独的 EP 管中。

(3). 向上述 EP 管中加入 30 μl 2xSDS Loading Buffer, 置于-20°C。

(4). 样品全部反应完毕后,样品煮沸 5 min,取 30 μl 进行 SDS-PAGE 分析。

(5). 如融合蛋白要求低温处理,可将反应液置于 4°C,请延长反应时间,并增加 rTEV 酶用量。

相关试剂配制:

1000X 四环素 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$): 取 200 μg 四环素盐酸盐 (SigmaT3383), 加入至 100ml 灭菌水中溶解。

1700X 氯霉素 (34mg/ml): 取 340mg 氯霉素 (SigmaC0378), 加入至 10ml 乙醇中溶解。

200X L-阿拉伯糖 (100mg/ml): 取 1g L-阿拉伯糖 (Sigma A3256), 加入至 10ml 灭菌水中溶解。

10X SUMO Buffer: 500 mM-HCl (pH8.0), 2% NP40,10 mM DTT。

20xrTEV Buffer: 1 M Tris-HCl (pH7.5), 10 mM EDTA, 20 mM DTT。