

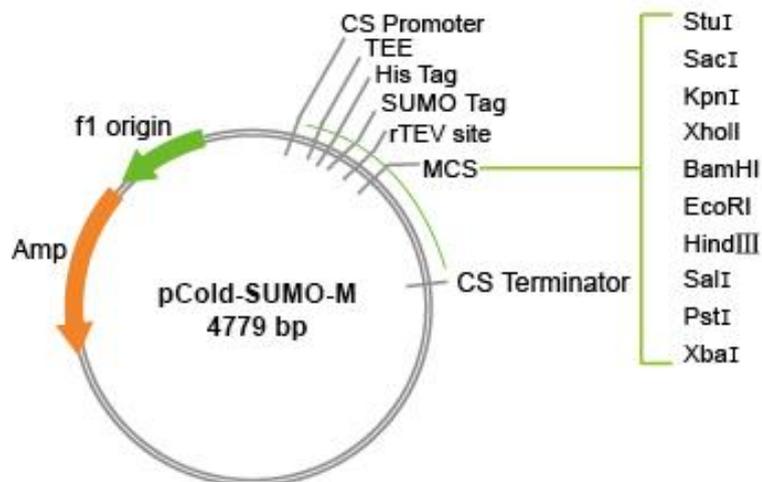
描述: 本试剂盒所包含的原核表达载体(pCold-SUMO)是在 pCold 载体基础上改造而成(HaiGene 专利), 该载体启动子(CS Promoter)来源于南极嗜冷细菌, 在低温下(15 度)才能启动蛋白的表达。低温下细菌生长缓慢, 使得蛋白合成速度减慢, 从而最大限度的提高了蛋白正确折叠的几率, 提高了蛋白可溶性表达, 增强了活性蛋白的表达比率。该表达系统所包含的 SUMO tag 可以极大地提高小分子量蛋白的表达量, 而且进一步提高了蛋白的可溶表达几率。同时, TEE 信号肽可增强冷启动子调控下目的蛋白的高表达。

BL21(DE3)Chaprone E.coli 细菌中含有分子伴侣蛋白质粒, 其表达产物可协助重组蛋白正确折叠形成可溶活性蛋白。分子伴侣蛋白质粒为氯霉素抗性 (chloramphenicol, Cm^r) 的表达受控于四环素 (tetR) 操纵子。

试剂盒配备的 rTEV 蛋白酶可以识别 SUMO 标签后面的 Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly 氨基酸序列, 并在识别位点 Gln-Gly 之间进行切割, 从而去除 SUMO 标签。

组分

名称	数量	保存
pCold-SUMO-M Vector (100 ng/μl)	50 μl	-20°C
rTEV Protease (10 U/μl)	100 μl	
20×rTEV Buffer	1 ml	
0.1M DTT	100 μl	
RTS BL21(DE3)Chaprone 感受态	50 μl × 10	
E.coli Transfer Reagent	0.6 ml	
pCold-SUMO Primer-F	100 μl	
pCold-SUMO Primer-R	100 μl	



CS Promotor TEE

CGCCATATCGCCGAAAGGCACACTTTAATTATTAAGAGGTAATACACCATG AAT CAC AAA GTG

MET Asn His Lys Val

6×His Tag

CAT ATG AAT TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA AGC AGC GGC AGC AGC GGC GGT CAT CAC CAT CAT CAT CAC
 His Met Asn Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Ser Ser Gly Ser Ser Gly Gly 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 pCOLD-SUMO Primer-R

GAA TTC AAG CTT GTC GAC CTG CAG TCT AGA TAG GTAATCTCTGCTTAAAAGCAGAGATCTAAGATCCCTGCCATTTGGCGGGGA
 Glu Phe Lys Leu Val Asp Leu Gln Ser Arg

操作方法

I. 重组质粒构建

1. 根据目的基因选择合适的酶切位点，将 pCold-SUMO-M 载体和插入片段分别进行双酶切，按如下反应进行双酶切反应（插入目的基因片段与载体相同）

pCold-SUMO-M Vector (100 ng/μl)	10 μl
内切酶反应 Buffer (10x)	5 μl
内切酶 1	5-10 U
内切酶 2	5-10 U
ddH ₂ O	Upto 50 μl

2. 酶切完成后经 1% 琼脂糖凝胶电泳，将线性载体进行凝胶回收。

3. 连接反应，反应体系如下：

酶切载体 (20 ng/μl)	1 μl
酶切目的基因片段 (60 ng/μl)	1 μl
10xLigation Buffer	1 μl
T4 DNA Ligase	1 μl
ddH ₂ O	2 μl

4. 取 5 μl 连接产物转入 TOP10 或 DH5α 感受态细胞，通过测序鉴定重组质粒。

注： Sequencing Primers:

pCold-SUMO Primer-F: 5'-CCCCTGAAGATTTGGACATG-3'

pCold-SUMO Primer-R: 5'-TGGCAGGGATCTTAGATTCTG-3'

宿主表达菌的选择：通常使用 pCold-SUMO 表达系统，在带有辅助折叠伴侣分子的 BL21(DE3)Chaprone 宿主菌中可获得最佳的可溶表达。该系统在常规 BL21(DE3)、BL21(DE3)plysS 等宿主菌内均可获得可观的可溶性表达。

II. 重组蛋白表达于 BL21(DE3)Chaprone 宿主菌

注意：该试剂盒配备的 RTS BL21(DE3)Chaprone 感受态为冻干粉感受态，可直接使用，效价约 10^4 cfu/μg。

1. 向 0.2ml EP 管中加入 50μl E.coli Transfer Reagent，并加入 2μl 构建的重组质粒（100ng），混合均匀，将混合液全部加入到一支 RTS BL21(DE3)Chaprone 感受态中吹打混合均匀，冰上放置 20min，42℃ 热激 45s，冰上放置 2min。将转化完毕的感受态吸入到一支装有 300μl LB 或 SOC 培养基的 1.5ml EP 管中，37℃ 摇床 220rpm 培养 60min。涂 150μl 于平板上（含 100μg/ml 氨苄青霉素，20μg/ml 氯霉素），37℃ 培养过夜。
2. 挑选生长良好的菌落，接入 LB 培养基（含 100μg/ml 氨苄青霉素，20μg/ml 氯霉素），37℃ 剧烈振荡培养过夜。
3. 1/50 比例接入新的 LB 培养基（含 100μg/ml 氨苄青霉素，20μg/ml 氯霉素，0.5mg/ml L-阿拉伯糖）37℃ 剧烈振荡培养 2h。
4. 加入终浓度 2ng/ml 四环素，37℃ 剧烈振荡培养至 OD600 约 0.5（约 2~4h）。
5. 待培养基冷却至 15℃ 后，再静置 30min。
6. 加入适量 IPTG(0.1-1 mM), 15℃ 振荡培养 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。

相关试剂配制:

1000 \times 四环素 (2 μ g/ml): 取 0.2mg 四环素盐酸盐 (SigmaT3383), 加入至 100ml 灭菌水中溶解。

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

200 \times 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。

III. 重组蛋白表达于 BL21(DE3)宿主菌

1. 将重组质粒转入表达宿主菌 BL21(DE3)感受态细胞 (含 100 μ g/ml 氨苄青霉素)。
2. 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。
4. 待培养基冷却至 15 $^{\circ}$ C 后, 再静置 30min。
5. 加入适量 IPTG(0.1-1 mM), 15 $^{\circ}$ C 振荡培养 24h。
6. 4,000 rpm 室温离心 15min, 收集细胞。
7. 用重悬液重悬细胞, 并置于冰上破碎。
8. 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

1. 融合 SUMO 标签的重组蛋白含有 6xHis 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

由于 SUMO 蛋白酶识别 SUMO 标签的结构, 有时候 SUMO 标签的结构受到重组蛋白的影响, 酶切效率低, 因此建议采用 rTEV 蛋白酶来切除 SUMO 标签【特异性识别 Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly 七氨基酸序列, 剪切位点在 Gln-Gly 之间】。切割后 SUMO 标签含 6xHis 标签、目的蛋白不含有 6xHis 标签, 所以可通过 Ni-NTA Resin 将 SUMO 标签和未完全切割的融合蛋白与不含 SUMO 标签的目的蛋白分离纯化。本 rTEV 蛋白酶 (HaiGene, C0501) 蛋白分子量为 30KD, 并含有 6xHis 标签可通过 Ni-NTA Resin 去除。

(1). 在 EP 管中配制如下反应体系

融合蛋白	20 μ g
20 \times rTEV Buffer	7.5 μ l
0.1M DTT	1.5 μ l
rTEV Protease	1-3 μ l
ddH ₂ O	Up to 150 μ l

(2). 30 $^{\circ}$ C 孵育, 在 1、2、4、6 小时分别吸出 30 μ l 上述反应液, 置于单独的 EP 管中。

(3). 向上述 EP 管中加入 30 μ l 2 \times SDS Loading Buffer, 置于-20 $^{\circ}$ C。

(4). 样品全部反应完毕后, 样品煮沸 5 min, 取 40 μ l 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 $^{\circ}$ C, 请延长反应时间, 并增加 rTEV 酶用量。