

Code No. 3340

研究用

Takara

Chaperone Plasmid Set

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	2
● 保 存	2
● 使用方法	2
● Q&A	4
● 参考文献	4
● 关联产品	4

Safety Precautions

Because the *araB* promoter and *araC* gene derived from *Salmonella typhimurium* are present on the Chaperone Plasmids pG-KJE8, pGro7, pKJE7, and pTf16, please follow all relevant guidelines for experiments using recombinant DNA as indicated by your organization when using this product.

● 制品说明

蛋白质的结构和功能分析是后基因组学领域面临的挑战之一，现已受到广泛关注。表达的大量重组蛋白质需要对其结构和功能进行测定，为了满足这一需求，便开发了多种表达系统。

大肠杆菌由于系统简单，在表达系统的选择上范围广泛，因此通常被用作蛋白质表达的宿主菌。但是，外源蛋白质在 *E.coli* 中表达时，常常出现表达的蛋白质形成包涵体或被蛋白酶降解的情况，原因大多是表达的蛋白质没能进行正确的折叠，这不利于研究蛋白质功能。

已证实，分子伴侣（Molecular Chaperones）或称伴侣蛋白参与蛋白质的折叠过程。为探究蛋白质的体内折叠机理，已投入了大量的研究工作。HSP Research Institute, Inc.在分子伴侣研究领域做出了显著的贡献。本 Chaperone Plasmid Set 含有五种类型的质粒，每一种质粒都能有效表达不同类型的伴侣蛋白组，各伴侣蛋白组协同作用、共同参与蛋白质折叠。据报道，目的蛋白质与其中一种“Chaperone team”共同表达，便可增加可溶性蛋白质的回收率，而使用通常方法，由于包涵体的形成，这些表达蛋白质常常是不可回收的（参见图 1）。

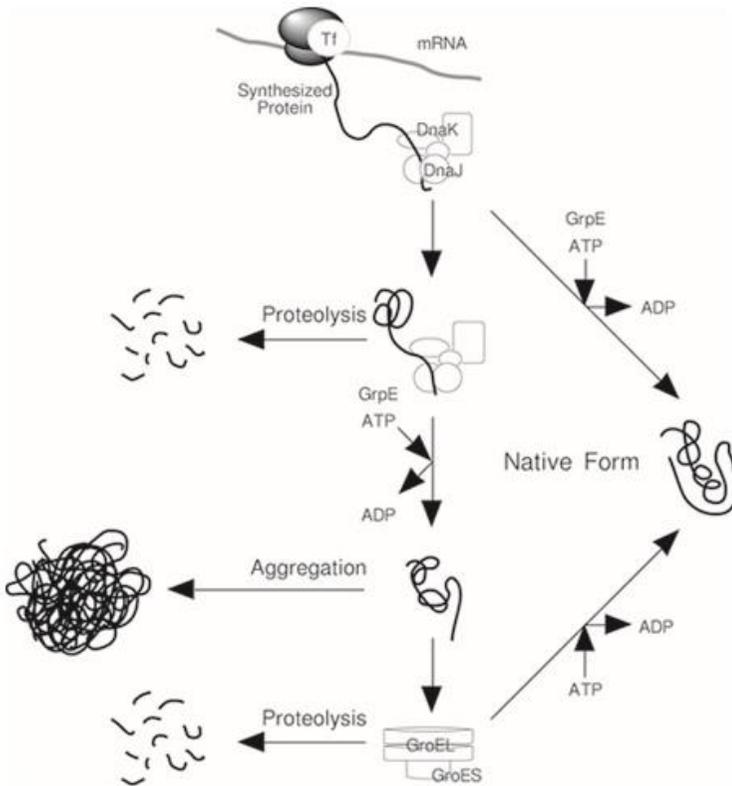


图 1. 伴侣蛋白对胞内蛋白质合成体系的作用（摘自文献 1）。

（可使用大肠杆菌表达体系）

伴侣蛋白质粒含有 pACYC 的复制起点和氯霉素抗性基因（Cm^r 基因），通常应用在大肠杆菌表达体系中，与 ColE1 型、具有氨苄抗性（Amp^r）筛选标记的表达载体共存。各伴侣蛋白质基因位于 *araB* 启动子或 P_zt-1（tet）启动子下游，而目的基因处于 *lac* 或其它启动子的控制之下，目的蛋白质与伴侣蛋白可分别诱导表达。另外，质粒上也具备启动子必要的元件（*araC* 或 *tetR*）。需注意的是该伴侣蛋白质粒不可以与含有氯霉素抗性基因的表达质粒共同使用。例如，常用的 pET 系列载体等可以使用 *E.coli* BL21（DE3）作为宿主，却不可以使用 *E.coli* BL21（DE3）pLysS 和 *E.coli* BL21（DE3）pLysE，因为它们分别包含了带有 Cm^r 基因、pACYC 复制起点的 pLysS 或 pLysE 质粒。

此外，可以考虑使用的宿主还有 *E.coli* JM109。

● 制品内容

Plasmid pG-KJE8	10 ng/ μ l	100 μ l
Plasmid pGro7	10 ng/ μ l	100 μ l
Plasmid pKJE7	10 ng/ μ l	100 μ l
Plasmid pG-Tf2	10 ng/ μ l	100 μ l
Plasmid pTf16	10 ng/ μ l	100 μ l

表 1: 各质粒编码的伴侣蛋白质种类及诱导物

No.	质粒	伴侣蛋白质	启动子	诱导物	抗性标记	参考文献
1	pG-KJE8	<i>dnaK-dnaJ-grpE</i> <i>groES-groEL</i>	<i>araB</i> <i>Pzt-1</i>	L-Arabinose Tetracyclin	Cm	2, 3
2	pGro7	<i>groES-groEL</i>	<i>araB</i>	L-Arabinose	Cm	2
3	pKJE7	<i>dnaK-dnaJ-grpE</i>	<i>araB</i>	L-Arabinose	Cm	2
4	pG-Tf2	<i>groES-groEL-tig</i>	<i>Pzt-1</i>	Tetracyclin	Cm	3
5	pTf16	<i>tig</i>	<i>araB</i>	L-Arabinose	Cm	3

● 保存: -20°C

● 使用方法

<伴侣蛋白质的共表达>

有效的伴侣蛋白种类、培养条件（培养基、培养温度、通气条件、起始诱导时刻、诱导物浓度、诱导时间等等）都随表达的目的蛋白质的不同而不同，以下为一般使用例。针对某一种目的蛋白质的最佳表达条件需要进行研讨。

1. 共表达体系的构建

构建目的蛋白质与伴侣蛋白的共表达体系，先制备转化有伴侣蛋白质粒的 *E.coli* 细胞，然后再将目的蛋白质表达质粒转化该 *E.coli* 细胞，这种两步法转化效果非常好。

而采用将伴侣蛋白质粒与目的蛋白质粒同时转化的一步转化法，或先转化目的蛋白质表达质粒、后转化伴侣蛋白质粒的两步法，转化效率均非常低，因此建议采用第一种方法。

- (1) 构建表达目的蛋白质的质粒。
- (2) 培养表达用的宿主大肠杆菌，然后按常规方法制备感受态细胞（使用商品化的感受态细胞也可以）。
- (3) 用本 kit 中提供的质粒转化 (2) 制备的感受态细胞，然后在含有氯霉素 (20 μ g/ml) 的平板上培养，筛选伴侣蛋白质粒转化体。（每次取 1 μ l 质粒转化）
- (4) 将伴侣蛋白质粒转化体在含有 20 μ g/ml 氯霉素的液体培养基中培养，再用通常方法将其制备成感受态细胞。
- (5) 用目的蛋白质表达质粒转化 (4) 制备的感受态细胞，并于含有氯霉素 (20 μ g/ml) 和表达质粒选择性生长抗生素的平板上培养，筛选转化体。

2. 共表达实验

以下为 *lac* 启动子下游插入了目的基因的 pUC 系列质粒 (Amp^r) 与本 Kit 中的伴侣蛋白质粒共表达实验例。更详细的培养条件请查阅参考文献，研讨出最佳的条件。

- (1) 准备含有 20 $\mu\text{g/ml}$ 氯霉素、50 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素、表达诱导用 0.5~4 mg/ml L-Arabinose, 以及 (或者) 1~10 ng/ml Tetracyclin* 的 LB 培养基, 30~37 $^{\circ}\text{C}$ 培养。使用 pG-KJE8 伴侣蛋白质粒时, L-Arabinose、Tetracyclin 需同时选用; 使用 pGro7、pKJE7、pTf16 伴侣蛋白质粒时, 只需选用 L-Arabinose; 使用 pG-Tf2 伴侣质粒时, 只需选用 Tetracyclin 即可。

* 请先尝试使用 0.5 mg/ml L-Arabinose 以及 (或者) 5 ng/ml Tetracyclin。低浓度的 Tetracyclin 对大肠杆菌的生长不会有太大影响。

- (2) 当 $\text{OD}_{600}=0.4\text{--}0.6$ 时, 加入 IPTG, 使其终浓度为 0.1~1.0 mM , 然后 30~37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1~4 小时。
- (3) 培养结束后, 根据 SDS-PAGE 电泳、活性测定等结果确认目的产物的表达量及溶解性, 研讨最佳的表达条件 (培养基、培养温度、通气条件、诱导开始时刻、诱导剂的浓度、诱导时间等)。

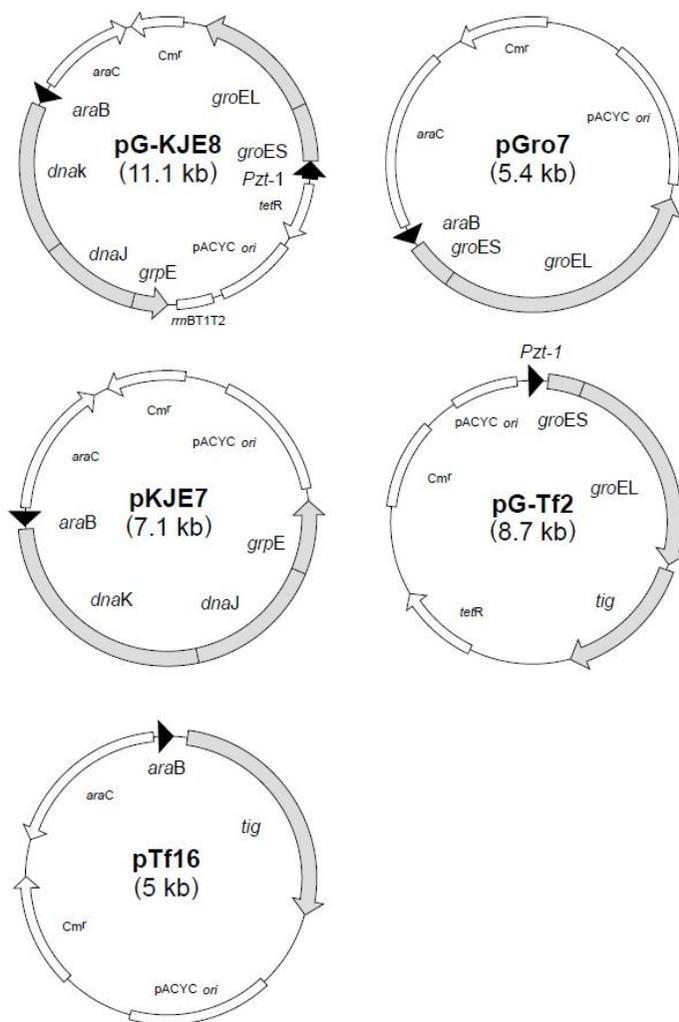


图 1. 伴侣蛋白质粒图谱

● Q&A

Q1. 表达的伴侣蛋白质分子量是多少?

A1. 据报道, GroEL (约 60 kDa)、GroES (约 10 kDa)、DnaK (约 70 kDa)、DnaJ (约 40 kDa)、Tf (约 56 kDa)、GrpE (约 22 kDa), 但与实际的 SDS-PAGE 电泳结果稍有差别。已确认 GrpE 电泳带在 Marker 29 kDa 电泳带的上方。

Q2. 表达的目的蛋白质如何精制?

A2. 表达的目的蛋白质通常是利用 His Tag 等亲和层析法精制, 非常方便。

利用 GST Tag 精制时, 精制产物进行 SDS-PAGE 电泳分析, 有时会看到伴侣蛋白质条带的存在。一般认为这是由于伴侣蛋白质与谷胱甘肽树脂发生了非特异性吸附而造成的残留, 进而与目的蛋白质一同被洗脱下来。

上述情况发生时, 有报道称采用以下方法可以使精制效果得到改善。

- 用离子交换树脂分离。 [*Proc Natl Acad Sci USA*. (1995) **92**:1048]
- 以 ATP-Agarose 为基质分离。 [*J Biol Chem* (1984), **259**:8820]
- 将吸附有融合蛋白质的树脂, 用含 3 mM Mg-ATP 的 Buffer 洗净。
- 将吸附有融合蛋白质的树脂, 在含 10 mM Mg-ATP、5 mg/ml casein 的 Buffer 中, 室温保温 20-40 分钟。

● 参考文献:

综述

1. Thomas, J. G., *et al.* Molecular Chaperones, Folding Catalysts, and the Recovery of Active Recombinant Proteins from *E. coli*. *Appl Biochem Biotech.* (1997) **66**: 197-238.

可溶性重组蛋白质与伴侣蛋白质的共表达

2. Nishihara, K., *et al.* Chaperone Coexpression Plasmids: Differential and Synergistic Roles of DnaK-DnaJ-GroE and GroEL-GroES in Assisting Folding of an Allergen of Japanese Cedar Pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* (1998) **64**: 1694-1699.
3. Nishihara, K., *et al.* Overexpression of Trigger Factor Prevents Aggregation of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* (2000) **66**: 884-889.

● 关联产品

pCold™ I DNA (Code No. 3361)
pCold™ II DNA (Code No. 3362)
pCold™ III DNA (Code No. 3363)
pCold™ IV DNA (Code No. 3364)
pCold™ Vector Set (Code No. 3360)
pCold™ TF DNA (Code No. 3365)

<Chaperone Competent Cell BL21 Series>

Chaperone Competent Cells BL21 Set (Code No. 9120)
Chaperone Competent Cell pG-KJE8/BL21 (Code No. 9121)
Chaperone Competent Cell pGro7/BL21 (Code No. 9122)
Chaperone Competent Cell pKJE7/BL21 (Code No. 9123)
Chaperone Competent Cell pG-Tf2/BL21 (Code No. 9124)

Chaperone Competent Cell pTf16/BL21 (Code No. 9125)

TaKaRa Competent Cell BL21 (Code No. 9126)

- * 每一种感受态细胞是由含有一种分子伴侣质粒的 *E. coli* BL21 制备而成。与 pCold DNA 系列载体共用对蛋白质的表达更有帮助。本产品不适合使用 T7 启动子的表达系统，如 pET 系统，因为 BL21 菌株作为宿主不表达 T7 RNA 聚合酶。

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takarabio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考Takara Bio Inc.网站。为正确使用Takara产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>