

Code No. 3371

研究用

Takara

pCold™ ProS2 DNA

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 载体图谱	1
● 保 存	2
● 操作方法	2
● 多克隆位点	2
● 实验例	2
● 附 录	4
● 参考文献	7
● 关联产品	7

● 制品说明

在后基因组研究中，蛋白质结构与功能的解析是一个重要的课题。有效的蛋白质表达系统对于获取大量的正确折叠的重组蛋白质至关重要。

以大肠杆菌为宿主的表达系统广泛应用于重组蛋白质的生产中。大肠杆菌表达系统具有使用方便和成本低的优点，但是，有一些基因会出现不能正确折叠表达或者表达的蛋白质形成包涵体颗粒而变得无活性、不可溶等问题。

为了解决这些问题，Takara 公司与 Prof. Masayori Inouye (University of Medicine and Dentistry of New Jersey, USA) 联合研发了冷休克表达载体 pCold DNA 系列，它利用了大肠杆菌的低温表达基因（冷休克基因），提高体内重组蛋白质的产量、纯度和可溶性。而且，整合到这些载体中的 *cspA* (cold shock protein A) 可在低温条件下，上调目的蛋白质的生产。温度的转换可抑制细胞内其他蛋白质的表达和阻碍整个细胞生长过程。这些效应有利于目的蛋白质高产量、高纯度（高达细胞蛋白质的 60%）的表达，相比于常规的 *E.coli* 表达系统，还能提高可溶性。

pCold ProS2 DNA 是一种融合冷休克表达载体，使用来源于革兰氏阴性菌 *Mycococcus xanthus* 中的 Protein S 作为可溶性标签。这种 Protein S 存在于粘细菌的孢子衣中，由 173 个氨基酸残基组成，是一种非常稳定的可溶性蛋白质。将两个 Protein S 的 N-末端结构域串联，再结合 ProS2 Tag 的作用，就能使融合目的蛋白的稳定性和可溶性得到提高。此外，由于目的蛋白和 ProS2-Tag 的相互作用性很低，因此可以将二者有效分离。

pCold ProS2 DNA Vector 在 *cspA* 启动子的下游插入了 5' 非编码区 (5' -UTR)、翻译增强元件 (TEE)、His-Tag 序列、ProS2-Tag 和多克隆位点 (MCS)。在 ProS2-Tag 和多克隆位点 (MCS) 之间主要是 HRV3C Protease、Thrombin 和 Factor Xa 的切断位点，用来消除融合蛋白质的标签。此外，在 *cspA* 启动子下游还插入了 *lac* operator，可以严格调控目的基因的表达。由于本制品的启动子是大肠杆菌来源的，所以大部分大肠杆菌都可以作为表达宿主使用。总之，pCold ProS2 DNA Vector 提供的冷休克技术，能够促进蛋白质的正确折叠，增加目的蛋白质的可溶性，对于一些棘手的蛋白质的表达是一个很好的选择。

● 制品内容

pCold ProS2 DNA Vector

25 μg

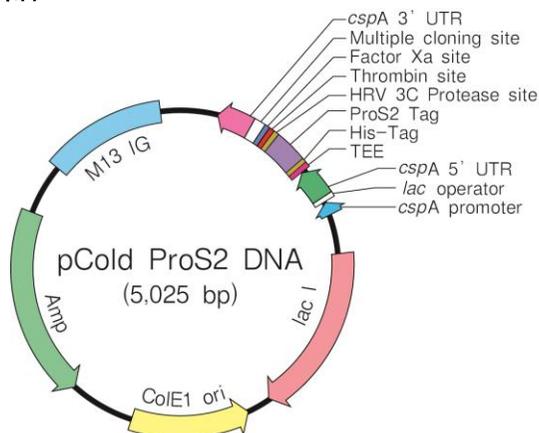
质粒贮存溶液：

10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA。

<大肠杆菌宿主>

pCold DNA 应用了大肠杆菌来源的冷休克基因 *cspA* 启动子，所以大部分大肠杆菌都可以作为宿主使用。

● 载体图谱



● 保存: -20°C

*自收到之日起, 适当条件下保存, 两年内有效。

● 操作方法

目的基因的表达方法

目的蛋白质不同, 其培养、诱导条件(培养基、培养温度、通气搅拌条件、诱导时间、诱导物浓度、诱导后的培养时间等)会有所不同, 所以必须对目的蛋白质的培养条件进行研讨。一般实验方法如下所述。

- (1) 在 pCold ProS2 DNA 多克隆位点处插入目的基因, 制备表达载体。
- (2) 用构建的表达载体转化大肠杆菌(如 BL21) 宿主, 在含有 Amp 的 LB 培养基平板上筛选转化子。
- (3) 接种转化子到含有 50~100 μg/ml Amp 的 LB 培养液中, 37°C 振荡培养。
- (4) 当培养液的 OD₆₀₀ 达到 0.4~0.5 时, 冷却培养液到 15°C, 放置 30 分钟。
- (5) 添加 IPTG 到终浓度 0.1~1.0 mM, 15°C 振荡培养 24 小时。
- (6) 培养完成后, 利用 SDS-PAGE 和活性测定确认目的产物的有无、表达量和可溶性。

通过筛选大肠杆菌宿主和优化培养、诱导条件(培养基、培养温度、通气搅拌条件、诱导时间、诱导物浓度、诱导后的培养时间等), 蛋白质的表达量和可溶性程度都会有所改善。在 N 末端的标签序列可以使用 Factor Xa、Thrombin 和 HRV3C Protease 去除。可使用 TALON[®] Metal Affinity Resins (Code No. 635501, etc.) 纯化带有 His-tag 的融合蛋白质。

● 多克隆位点

pCold ProS2 DNA



● 实验例

pCold ProS2 DNA 与 pCold I DNA 相比较的表达实验例。将 pCold ProS2 DNA 与 pCold I DNA 转化到 *E. coli* BL21 细胞中, 培养转化子, 依据各自的操作方法表达蛋白质。

(1) 可溶性蛋白质表达实验例

使用 pCold I DNA 表达, 没有检测到酶蛋白 A (估计分子量为 52.4 kDa) 的清晰条带。相反, 使用 pCold ProS2 DNA, 检测到~75 kDa 目的蛋白质 (52.4 kDa 蛋白质+23 kDa 标签) 条带, 蛋白质大部分都是可溶性片段 (图 2)。

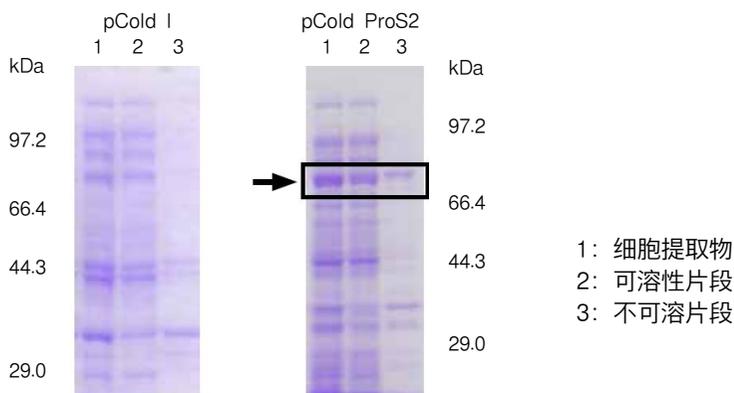


图 2: 酶蛋白 A 的表达情况比较

(2) 蛋白质产量增大的实验例

使用 pCold I DNA 表达, 没有检测到蛋白 B (分子量为 43.3 kDa) 的清晰条带。但使用 pCold ProS2 DNA, 检测到~66 kDa 目的蛋白质 (43.3 kDa 蛋白质+23 kDa 标签) 条带, 蛋白质大部分都是可溶性片段 (图 3)。

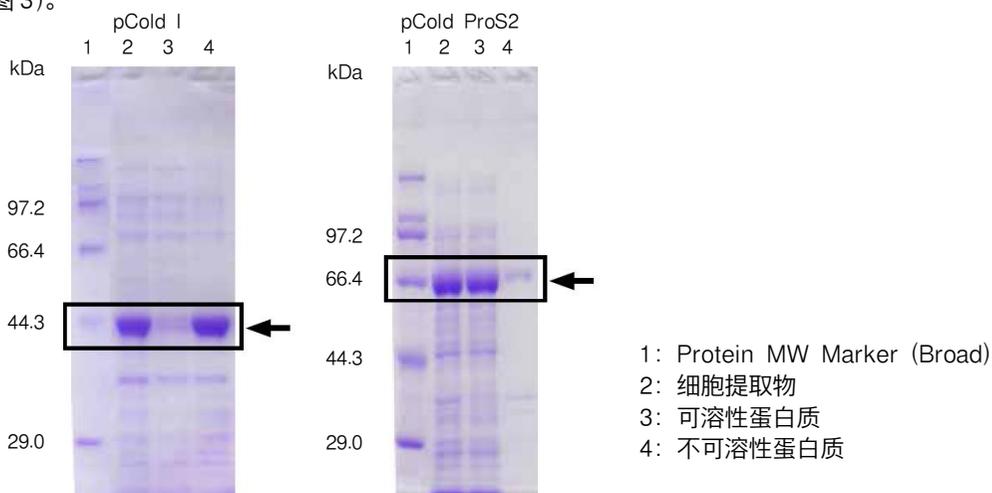


图 3: 蛋白质 B 的表达情况比较

(3) 从融合蛋白质上去除标签蛋白的实验例

使用 Ni 柱纯化 (2) 中的融合蛋白质后, 采用 HRV 3C protease 去除标签蛋白。再使用 Ni 柱纯化目的蛋白质, 分离获得 43.3 kDa 的目的蛋白质。

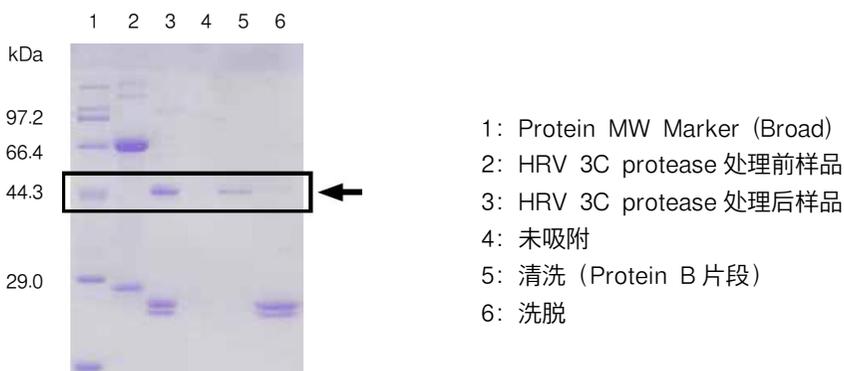


图 4: 目的蛋白质和标签蛋白的分离

● 附 录

构建表达质粒

1) pCold ProS2 DNA 表达载体构建概述

- a) 选择一个与 pCold ProS2 DNA 载体符合读码框的 DNA 片段的限制性酶切位点。
- b) 制备 DNA 片段。
- c) 线性化 pCold ProS2 DNA 载体。
- d) 连接 DNA 片段和线性化载体，转化到适合的 *E. coli* 菌株中。
- e) 从含有目的片段的转化株中纯化质粒。
- f) 将纯化后的质粒用于蛋白质表达实验。

插入片段 DNA 可以通过 PCR 扩增、酶切含有目的基因的质粒、人工合成基因等方法来获得。克隆在 pCold I-IV 和 pCold TF 载体上的片段可以很容易转移到 pCold ProS2 DNA 中，因为这些载体的多克隆位点是一致的。In-Fusion[®] Cloning Kit 可用于快速定向克隆，尤其适用于目的基因序列上没有适合的限制性酶切位点的情况。下面是 PCR 扩增制备插入片段 DNA 的实验例。

2) 制备 *E. coli* 硫氧还蛋白表达质粒的实验例

a) 引物设计

- i. 选择两种在插入片段 DNA 和 pCold ProS2 DNA 的 MCS 中均存在的限制酶。
- ii. 设计目的序列的引物，在每条引物的 5' 末端添加限制酶识别序列。调整插入片段 DNA 序列和 N 末端限制酶识别序列间的核苷酸个数，以便插入片段 DNA 的读码框能够与 pCold ProS2 DNA 上的 ProS2 标签读码框相匹配。其中一条引物可以在 C 末端添加终止密码子。
- iii. 在限制酶识别序列的外侧添加 4 个或更多的保护碱基，以便限制酶能够有效酶切。没有保护碱基时，酶切效率可能会有所降低。

[引物设计]

使用 *Nde*I 和 *Xho*I 限制酶消化硫氧还蛋白基因，插入到 *Nde*I/*Xho*I 消化后的 pCold ProS2 DNA 载体中。

*Nde*I 位点：Primer 1 (正向引物)



*Xho*I 位点：Primer 2 (反向引物)



*1：应用 *Nde*I 酶切位点时，应调整硫氧还蛋白的基因起始密码子 ATG 的位置与 *Nde*I 的 ATG 的位置相吻合。

*2：含有终止密码子的互补序列。

b) 制备插入片段

[PCR 扩增硫氧还蛋白基因 (约 350 bp)]

i. PCR 扩增

配制下述试剂的反应液 (建议使用高保真酶，如 PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase (Code No. R010A))。

Template DNA (5 ng)* ¹	1 μl
5×PrimeSTAR Buffer* ²	10 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each)* ²	4 μl
Primer 1 (10 – 50 pmol/μl)	1 μl
Primer 2 (10 – 50 pmol/μl)	1 μl
PrimeSTAR DNA Polymerase (5 U/μl)	0.5 μl
灭菌水	32.5 μl
Total	50 μl

使用 TaKaRa Thermal Cycler Dice™ *Touch/Gradient* (Code No. TP350/TP600)按如下程序对目的基因进行 PCR 扩增。

98°C	10 sec.] 30 cycles
55°C	5~15 sec.	
72°C	1 min.	

*1: 以质粒为模板时添加量为 10 pg~1 ng, 以 cDNA 和基因组 DNA 为模板时添加量为 5~200 ng。

*2: 5×PrimeSTAR Buffer 和 dNTP Mixture 附带在 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 中。

ii. 确认扩增产物

取反应液 5 μl 进行琼脂糖凝胶电泳, 确认扩增片段条带单一、正确。

iii. 纯化扩增产物

扩增产物为单一条带时, 建议使用酚/氯仿抽提纯化。扩增产物为多条带时, 需进行 Agarose 凝胶电泳, 再使用 NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Code No. 740609.10/.50/.250) 等类似方法进行进一步纯化。

iv. 扩增产物限制酶消化

使用 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切精制后的 DNA 片段。

a. 配制酶切反应液

Insert DNA; 0.5~1 μg	x μl
10× K Buffer	3 μl
<i>Nde</i> I (10 U/μl)	1 μl
<i>Xho</i> I (10 U/μl)	1 μl
灭菌水	y μl
Total	30 μl

b. 37°C 反应 1 小时。

c. 反应液进行乙醇沉淀, 回收 DNA。*

d. 凝胶电泳、测定 OD₂₆₀ 确认 DNA 片段的大小和浓度。

*: 乙醇沉淀可以使 *Nde* I 和 *Xho* I 失活。如果乙醇沉淀不能使限制酶完全失活, 反应液需要进行酚处理。此外, 可以通过凝胶回收进一步纯化, 酶切产生的小片段能够完全除去。

[乙醇沉淀方法]

- ① 按样品体积的 1/10 加入 3 M 醋酸钠 (pH5.2), 混匀 (例如 30 μl 酶切混合液加入 3 μl 3 M 的醋酸钠)。
- ② 按样品体积的 2~2.5 倍加入 100%冷乙醇 (如 33 μl 含有醋酸钠的酶切混合液加入 66 μl 冷乙醇), 混匀, -20°C 放置 30 分钟以上。
- ③ 4°C, 12,000 rpm 离心 10~15 分钟, 除去上清液。
- ④ 加入 70%冷乙醇, 4°C, 12,000 rpm 离心 5 分钟。
- ⑤ 除去上清, 干燥。
- ⑥ 加入 10~50 μl 的 TE buffer, 溶解 DNA。

c) pCold ProS2 DNA 限制酶消化

使用与消化扩增片段一样的限制酶，消化冷休克载体 pCold ProS2 DNA，然后精制。精制后的 DNA 用 TE buffer 溶解，测定吸光度，确定 DNA 浓度。

i. 按如下成分配制反应液

pCold ProS2 DNA	1 μ g
10 \times K Buffer	3 μ l
<i>Nde</i> I (10 U/ μ l)	1 μ l
<i>Xho</i> I (10 U/ μ l)	1 μ l
灭菌水	x μ l
<hr/>	
Total	30 μ l

ii. 37 $^{\circ}$ C 反应 1~2 小时。

iii. 反应液进行乙醇沉淀，回收 DNA。*

iv. 用适当 TE Buffer 溶解。

v. 测定吸光度 (OD₂₆₀)，计算 DNA 浓度。dsDNA: 1 OD₂₆₀ = 50 μ g/ml

vi. 调整浓度到 100 ng/ μ l。

*: 限制酶消化后，用 Alkaline Phosphatase [BAP (Code No. 2120A)、CIAP (Code No. 2250A)] 进行去磷酸化反应会更好一些。但是，如果只用一种限制酶消化时，则必须进行去磷酸化反应。

d) DNA 片段插入 pCold 载体后转化

i. 连接反应

限制酶消化后的载体和 DNA 片段混合，使用 DNA Ligation Kit<Mighty Mix> (Code No. 6023) 进行连接反应。我们推荐载体和 insert 的摩尔比为 1: 3~1: 10。

在冰上配制连接反应液:

Digested pCold DNA; 100 ng (~0.03 pmol)	1 μ l
Insert DNA fragment (0.1~0.3 pmol)	4 μ l
<u>Ligation Mix (from DNA Ligation Kit<Mighty Mix>)</u>	<u>5 μl</u>
Total	10 μ l

16 $^{\circ}$ C 反应 1 小时。

ii. 转化

a. *E. coli* HST08 Premium Competent Cells 使用前冰中融化。

b. 连接反应液 10 μ l 全量加至 100 μ l Competent Cells 中，混合均匀。

c. 冰中放置 30 分钟。

d. 42 $^{\circ}$ C 加热 45 秒钟。

e. 冰中放置 1~2 分钟。

f. 加入 (37 $^{\circ}$ C 保温) SOC 培养基至终体积为 1 ml，

g. 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 1 小时。

h. 在含有 Amp (100 μ g/ml) 的 L-琼脂平板培养基上 37 $^{\circ}$ C 过夜培养，形成单菌落。

e) 质粒的制备与确认

在 d) -ii 所得克隆接种到适量的含有 Amp (100 μ g/ml) 的 LB 培养液中，37 $^{\circ}$ C 过夜培养，然后提取质粒。使用限制酶消化提取的质粒，电泳确认是否含有插入片段 DNA。

当确认提取的质粒含有插入片段 DNA 后，还需测序确认 DNA 片段的序列，含正确序列 DNA 的质粒可以作为表达载体使用。测序时使用引物如下所示:

上游引物 pCold-PrS2-F1 primer: 5' -CACGCGGTAGTGGTGGTATC

pCold-PrS2-F2 primer: 5' -CGGGTCTGGAAGTTCTGTTC

下游引物 pCold-R Primer: 5' -GGCAGGGATCTTAGATTCTG

● 参考文献

- 1) Qing G., *et al. Nature Biotechnology.* (2004) **22**: 877–882.
- 2) Inouye M., *et al. Proc Natl Acad Sci. USA* . (1979)**76**: 209–213
- 3) Kobayashi H, Yoshida T, and Inouye M. *Appl Environ Microbiol* . (2009) **75**(16): 5356–5362.

● 关联产品

蛋白质表达和纯化关联产品

[Induction of target protein expression]

TaKaRa Competent Cells BL21 (Code No. 9126)

IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) (Code No. 9030)

[His-tagged fusion protein purification]

TALON[®] Metal Affinity Resin (Code No. 635501–635504/635652/635653)

TALON[®] Superflow Metal Affinity Resin (Code No. 635506/635507/635668–635670)

HisTALON[™] Superflow Cartridge Purification Kit (Code No. 635649/635681)

[pCold vector series]

pCold[™] DNA vector series (Code No. 3360–3364)

pCold[™] TF DNA (Code No. 3365)

pCold[™] GST DNA (Code No. 3372)

克隆关联产品

[PCR amplification of target genes]

PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase (Code No. R045A)

PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase (Code No. R050A/B)

PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase (Code No. R010A/B)

Tks Gflex[™] DNA Polymerase (Code No. R060A/B)

[Purification of target gene fragments]

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Code No. 740609.10/.50/.250)

[Insertion of a DNA fragment into a vector and transformation]

In-Fusion[®] HD Cloning Plus (Code No. 638909)

In-Fusion[®] HD EcoDry[™] Cloning Plus (Code No. 638912)

E. coli HST08 Premium Competent Cells (Code No. 9128)

E. coli DH5 α Competent Cells (Code No. 9057)

E. coli JM109 Competent Cells (Code No. 9052)

E. coli HST08 Premium Electro-Cells (Code No. 9028)

E. coli DH5 α Electro-Cells (Code No. 9027)

E. coli JM109 Electro-Cells (Code No. 9022)

[Plasmid preparation from *E. coli*]

NucleoSpin Plasmid EasyPure (Code No. 740727.10/.50/.250)

PrimeSTAR is a registered trademark of Takara Bio Inc.

TALON and In-Fusion are registered trademarks of Takara Bio USA, Inc.

pCold, Tks Gflex, and Thermal Cycler Dice are trademarks of Takara Bio Inc.

HisTALON and EcoDry are trademarks of Takara Bio USA, Inc.

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.takara-bio.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: <http://www.takarabiomed.com.cn>