

Code No. 9120–9125

研究用

Takara

Chaperone Competent Cell
BL21 Series

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	2
● 实验操作方法	2
● 共表达实验	3
● 转化效率	4
● Genotype	4
● 实验例	4
● Q & A	4
● Chaperone 质粒载体图谱	5
● 参考文献	6
● 关联产品	6

Precautions for use :

Because the *araB* promoter and *araC* gene derived from of *Salmonella typhimurium* are contained in Chaperone Plasmid pG-KJE8, pGro7, pKJE7, and pTf16, please follow the guideline for experiments using recombinant DNA issued by the relevant authorities and the safety committee of your organization of your country in using this product.

NOTICE :

The intellectual property of the plasmids supplied in this product is owned by Takara Bio Inc. It is prohibited to use this product for any commercial purpose or to transfer this product to a third party. Individual license agreement must be concluded with Takara Bio Inc. when this product is used for industrial purposes.

The modified plasmid may also be subject to the ownership of Takara Bio Inc. Accordingly, to use the modified plasmid for any commercial purpose or to transfer it to a third party requires a prior contact to Takara Bio Inc.

The use of this product is limited for research purposes. It must not be used for clinical purposes or for *in vitro* diagnosis.

● 制品说明

Chaperone Competent Cell BL21 Series 是由五种分别转化一种伴侣蛋白质粒 (Chaperone Plasmid Set (Code No.3340)) 的 *Escherichia coli* BL21 制成的感受态细胞。

众所周知, 分子伴侣参与蛋白质折叠过程, 且人们已经通过大量的实验研究来表明体内蛋白折叠机理。

本制品中含有五种类型的质粒(pG-KJE8、pGro7、pKJE7、pG-Tf2、pTf16), 每一种质粒都是能有效表达一组协同作用、共同参与蛋白折叠的被称作“Chaperone team”的分子伴侣。靶蛋白与其中一种“Chaperone team”共同表达, 便可增加可溶性蛋白质的回收比率, 而用通常方法, 由于包涵体的形成, 这些表达蛋白质常常是不可回收的。

E.coli BL21 来源于 B 株, 为 *Lon* 蛋白水解酶、*ompT* 外膜蛋白水解酶缺陷型。因此, 表达的外源蛋白质在该体系中有更高的稳定性。

当进行靶蛋白与“Chaperone team”共表达实验时, 通常需要三步:

1. 用伴侣蛋白质粒转化宿主 *E.coli*; 2. 用转化体制备感受态细胞; 3. 用质粒转化感受态细胞并表达靶蛋白。如果使用本产品, 只需一步转化就可构建靶蛋白与“Chaperone team”的共表达体系, 因为使用的 *E.coli* BL21 感受态细胞已转化有一种伴侣蛋白质粒。另外, 此感受态细胞有五种质粒, 不含有伴侣蛋白质粒的 TaKaRa Competent BL21 也可作为对照。

每种 *E.coli* BL21 感受态细胞包括一种伴侣蛋白质粒, 非常适合 pCold DNA 系列的表达。但该产品不适合于启动子为 T7 的蛋白质表达体系, 如 pET 系列, 因为, 宿主 *E.coli* BL21 菌株不表达 T7 RNA 聚合酶。

注意: 本产品不可用于电击法转化。

● 制品内容

● Chaperone Competent Cells BL21 Set (Code No. 9120)

1. Chaperone Competent Cells pG-KJE8/BL21	3 × 100 μl
2. Chaperone Competent Cells pGro7/BL21	3 × 100 μl
3. Chaperone Competent Cells pKJE7/BL21	3 × 100 μl
4. Chaperone Competent Cells pG-Tf2/BL21	3 × 100 μl
5. Chaperone Competent Cells pTf16/BL21	3 × 100 μl
6. TaKaRa Competent Cell BL21	3 × 100 μl
7. pUC19 DNA (0.1 ng/μl)	1 × 10 μl
8. SOC medium*	18 × 1 ml

● Chaperone Competent Cells pG-KJE8/BL21 (Code No. 9121)

● Chaperone Competent Cells pGro7/BL21 (Code No. 9122)

● Chaperone Competent Cells pKJE7/BL21 (Code No. 9123)

● Chaperone Competent Cells pG-Tf2/BL21 (Code No. 9124)

● Chaperone Competent Cells pTf16/BL21 (Code No. 9125)

Code No. 9121-9125

1. Competent Cell	10 × 100 μl
2. pUC19 DNA (0.1 ng/μl)	1 × 10 μl
3. SOC medium*	10 × 1 ml

* SOC medium

2%	Tryptone
0.5%	Yeast extract
10 mM	NaCl
2.5 mM	KCl
10 mM	MgSO ₄
10 mM	MgCl ₂
20 mM	Glucose

表 1：各质粒编码的伴侣蛋白种类及诱导物

No	Plasmid	Chaperone	Promoter	Resistant Marker	Inducer (终浓度)
1	pG-KJE8	dnaK-dnaJ-grpE groES-groEL	<i>araB</i> <i>Pzt-1</i>	Cm	L-Arabinose (0.5-4 mg/ml) Tetracyclin (1-10 ng/ml)
2	pGro7	groES-groEL	<i>araB</i>	Cm	L-Arabinose (0.5-4 mg/ml)
3	pKJE7	dnaK-dnaJ-grpE	<i>araB</i>	Cm	L-Arabinose (0.5-4 mg/ml)
4	pG-Tf2	groES-groEL-tig	<i>Pzt-1</i>	Cm	Tetracyclin (1-10 ng/ml)
5	pTf16	tig	<i>araB</i>	Cm	L-Arabinose (0.5-4 mg/ml)

〈可使用的表达质粒〉

伴侣蛋白质粒带有来源于 pACYC 的复制起始位点和氯霉素抗性基因 (Cm^r 基因)，可以与常用的 ColE1 型、具有氨苄抗性 (Amp^r) 筛选标记的载体共存于 *E.coli* 表达体系中。各伴侣蛋白基因位于 *araB* 启动子或 *Pzt-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，对启动子必要的元件 (*araC* 或 *tetR*) 也配置在质粒上。需注意的是该伴侣蛋白质粒不可与含有氯霉素抗性基因的表达质粒共同使用。

● 保 存

-80°C

注意：如果不是-80°C保存，转化效率将会降低。此时，可在使用前用附带的 pUC19 做转化实验，确认转化效率。不能保存在液氮中。

● 实验操作方法

1. 感受态细胞使用前在冰中融化。
2. 细胞融化后，轻柔混合均匀，取 100 μl 移入聚丙烯 tube 中 (FALCON Code No. 352059 或 352057)。
注意：不能剧烈振荡。
3. 加入目的蛋白质表达用质粒 (≤10 ng)。
4. 冰中放置 30 分钟。
5. 42°C放置 45 秒。
6. 立即移入冰中放置 1-2 分钟。
7. 加入 37°C预温的 SOC 培养基达到终体积 1 ml。

8. 37°C振荡培养 1 小时 (160~225 rpm)。
9. 将适量培养液*1 涂布在 L-broth*2 平板上。
10. 37°C过夜培养。

*1: 使用直径 9 cm 的平板时, 请取 100 μ l 以下的培养液涂布平板。

*2: 对于 Chaperone Competent Cells, 选用的 LB 平板应同时含氯霉素及表达质粒选择性生长所需的抗生素。当使用 TaKaRa Competent Cells BL21 时, LB 平板中只含表达质粒选择性生长所需的抗生素就可以了。

使用注意

1. 从-80°C中只取出实验所用的感受态细胞, 然后立即放入干冰/EtOH bath。开始实验前不要取出。
2. 可使用 1.5 ml microtube 替代 FALCON tube, 但可能会降低效率。
3. 使用 100 μ l 感受态细胞转化时, 高纯度 DNA 使用量不要超过 10 ng, 否则转化效率会降低。
4. 转化体系改变 (如感受态细胞使用量发生改变) 或换用了其它 tube 等, 需研讨转化条件 (如使用一般的 1.5 ml tube 时, 请于 42°C保温 60 秒)。
5. 除 SOC 培养基外, L-broth 及 ϕ b-broth 也可使用, 但转化效率会有所下降。
6. 稀释时, 使用 SOC 培养基。

L-broth plate: 成份	per liter
Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	5 g

用 1N NaOH 调整到 pH7.5, 添加 agar 到 1.5%, 高压灭菌。

8. 不建议将解冻的感受态细胞再次冷冻保存。如果再次冻结不可避免, 将细胞置于干冰/乙醇中迅速冷冻, 置于-80°C保存。但是, 转化效率可能会降低至少一个数量级。
9. 本制品中含有的伴侣蛋白质粒带有来源于 pACYC 的复制起点和氯霉素抗性基因 (Cm^r), *E.coli* 表达系统中可以使用常用的 ColE1 型、具氨苄抗性 (Amp^r) 筛选标记的表达载体, 但不可与含有氯霉素抗性基因的表达质粒共同使用。

● 共表达实验

培养基中需加入目的蛋白表达质粒选择性生长所需的抗生素、伴侣蛋白质粒选择性生长所需的抗生素 (氯霉素 20 μ g/ml) 以及与各伴侣质粒种类相对应的诱导物 (参见表 1)。当细胞生长受到阻害较大时, 在靶蛋白诱导表达前添加诱导物。适合的伴侣蛋白种类、培养条件 (培养基、培养温度、通气条件、诱导起始时刻、诱导物浓度、诱导时间等等) 均由于表达的目的蛋白的不同而不同。因此, 建议研讨目的蛋白表达的适宜条件。

以下为插入外源目的基因的 pCold I DNA (Code No. 3361) 与伴侣质粒共表达实验例。

1. 准备含 20 μ g/ml 氯霉素、50-100 μ 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。伴侣蛋白质粒是 pG-KJE8 时, 同时选用 L-Arabinose 和 Tetracyclin; 伴侣蛋白质粒是 pGro7、pKJE7、pTf16 时, 只选用 L-Arabinose; 伴侣质粒是 pG-Tf2 时, 只用 Tetracyclin 即可。

请先尝试使用 0.5 mg/ml L-Arabinose 和 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. 将同时含有 pCold I DNA 和 Chaperone Plasmid 的菌株接种到培养基中, 37°C振荡培养。
3. 当 $OD_{600}=0.4-0.6$ 时, 于 15°C放置 30 分钟。
4. 加入 IPTG, 使其终浓度为 0.1-1.0 mM, 15°C振荡培养 24 小时。
5. 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。

● 转化效率

Chaperone Competent Cells: 转化 1 ng pUC19, 涂于 Cm⁺和 Amp⁺平板上进行筛选。

TaKaRa competent Cell BL21: 转化 1 ng pUC19, 涂于 Amp⁺平板上进行筛选。

转化效率 $\geq 1 \times 10^6$ cfu/ μ g pUC19

● Genotype

E.coli BL21 : F⁻, *ompT*, *hsdSB* (rB⁻ mB⁻), *gal*, *dcm*

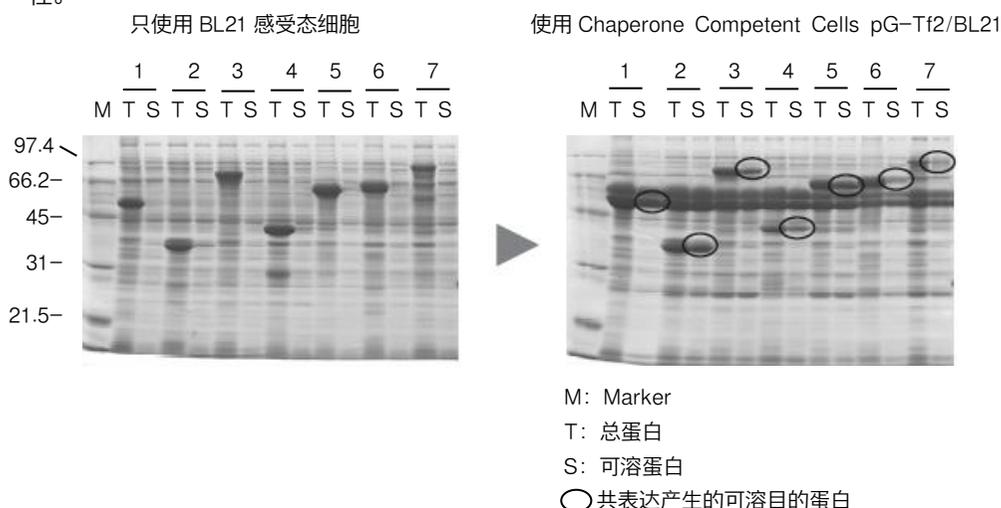
● 实验例

Chaperone Competent Cells 用于表达 7 种单独使用 pCold I DNA 不能有效表达的人源基因。

Chaperone Competent Cell pG-Tf2/BL21 用于共表达实验。

实验操作参照“共表达实验”。

结果显示, 在与伴侣蛋白质粒的共表达实验中, 单独使用 pCold I DNA 表达的不溶性靶蛋白具有了可溶性。



● Q & A

Q1: 表达的伴侣蛋白大小多少?

A1: GroEL: 60 kDa, GroES: 10 kDa, DnaK: 70 kDa, DnaJ: 40 kDa, Tf: 56 kDa, GrpE: 22 kDa。这些数据公布于已发表的文献, 可通过电泳得到确认。

例如, GrpE 的条带可在 29 kDa 的 marker 之上检测到。

Q2: 怎样纯化表达的蛋白质?

A2: 使用 His-Tag 的亲和纯化法, 操作方便 (pCold DNAs 使用 His-Tag)。

当使用 GST-Tag 纯化时, 纯化后可通过 SDS-PAGE 检测到伴侣蛋白, 这是由于 glutation 树脂上非特异性吸附导致的。

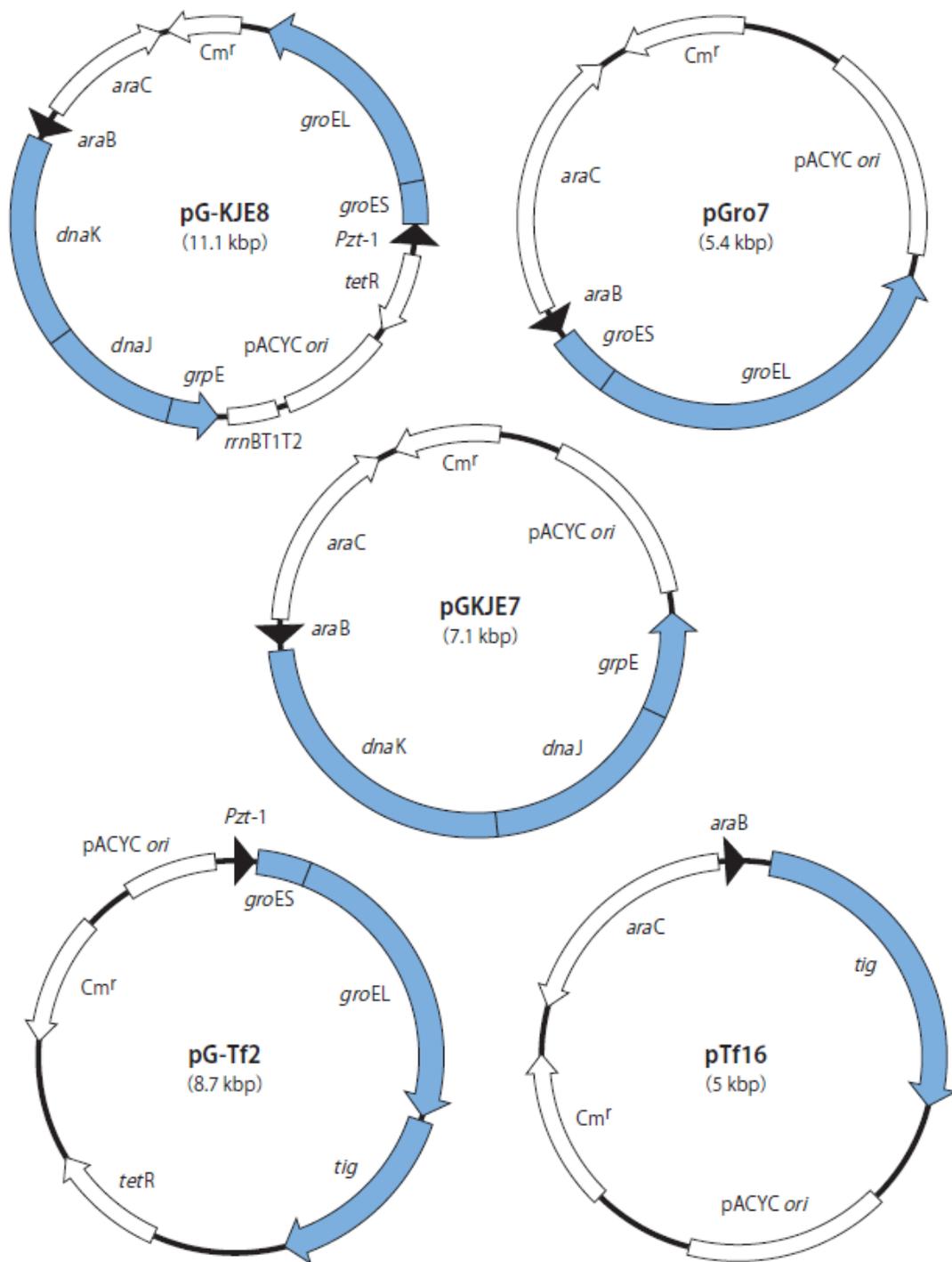
此时, 以下方法可改善纯化效果:

- 离子交换树脂分离。(Proc. Natl. Acad. Sci USA. (1995) **92**: 1048)
- ATP-Agarose 分离。(J Biol Chem. (1984) **259**: 8820)
- 用含有 3 mM Mg-ATP 的 buffer 冲洗吸附蛋白的树脂。
- 将吸附蛋白的树脂浸入含有 10 mM Mg-ATP 和 5 mg/ml 酪蛋白的 buffer, 室温放置 20-30 分钟。

使用 His-Tag 的纯化方法还未见有以上情况的报道。

因此, 当使用 Chaperone Competent Cells 时, 建议用 His-Tag 纯化法纯化表达后的蛋白质。

● Chaperone 质粒载体图谱



● 参考文献

- 1) Thomas J G, *et al. Appl Biochem Biotech.* (1997) **66**: 197–238.
- 2) Nishihara K, *et al. Appl Environ Microbiol.* (1998) **64**: 1694–1699.
- 3) Nishihara K, *et al. Appl Environ Microbiol.* (2000) **66**: 884–889.

● 关联产品

Chaperone Plasmid Set (Code No. 3340)
pCold Vector Set (Code No. 3360)
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 TF DNA (Code No. 3365)
pCold ProS2 DNA (Code No. 3371)
pCold GST DNA (Code No. 3372)
IPTG (Code No. 9030)

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>

v202104Da