

Code No. 3365

研究用

Takara

pCold™ TF 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
● 使用方法	2
● 多克隆位点图谱	2
● 实验例	2
● Q&A	3
● 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，蛋白质的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在后基因组学研究中是一项必不可少的基础性技术。以大肠杆菌为宿主的表达系统广泛应用于重组蛋白质的制备。大肠杆菌表达系统具有使用方便和成本低的优点，但是，有一些重组蛋白质不能正确折叠而形成难溶解的包涵体。为了解决这些问题，Takara 公司与 Professor Masayori Inouye (University of Medicine and Dentistry of New Jersey, USA) 联合研究开发了冷休克表达载体 pCold DNA 系列。使用冷休克表达载体能够提高重组蛋白质胞内的产量、纯度以及溶解度。此类载体带有 *cspA* (冷休克蛋白 A) 启动子及相关元件，使得菌体在低温 (37°C–15°C) 环境下培养时，目的蛋白质的产量得到了提高，这是因为低温环境能抑制其它细胞蛋白质的表达并抑制细胞的生长。这一过程可实现目的蛋白质高纯度 (高达 60% 的细胞蛋白)、高产量的表达，与传统的 *E. coli* 系统相比，可溶性更高。

虽然伴侣蛋白质可以有效地提高目的蛋白质的可溶性 (请参考 Takara 公司的 Chaperone Plasmid Set [Code No. 3340])，但是在大肠杆菌中表达目的蛋白质的同时，共表达一个或多个伴侣蛋白质会增加转化操作复杂性。

pCold TF DNA 的研发则避免了转化操作的复杂性，它是一种以大肠杆菌的伴侣蛋白 Trigger Factor (TF) 作为可溶性标签的融合型冷休克表达载体。TF 分子量为 48 kDa，Trigger Factor 是一种原核的核糖体结合伴侣蛋白质，能够促进新生肽链的共翻译折叠。TF 来源于大肠杆菌，与其他生物来源的标签相比，在大肠杆菌中表达效率高，可溶性效果好。

本载体在 *cspA* 启动子下游插入了 5' 非编码区 (5' UTR)、TEE (翻译增强元件) 序列、His-Tag 序列、TF 序列和多克隆位点 (MCS)。在 *cspA* 启动子下游还插入了 *lac* operator，可以严紧调控蛋白质表达。并且在 TF 序列和 MCS 之间插入 HRV 3C Protease、Thrombin 和 Factor Xa 的切断位点，用来消除融合蛋白质的标签。pCold TF DNA 应用大肠杆菌的启动子，和其他的 pCold DNA 一样，大多数的大肠杆菌都可以作为表达宿主。利用 pCold TF DNA，通过 TF 的可溶性标记功能和分子伴侣作用，可以使难表达的基因得到可溶性表达。

● 制品内容

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

● 载体图谱

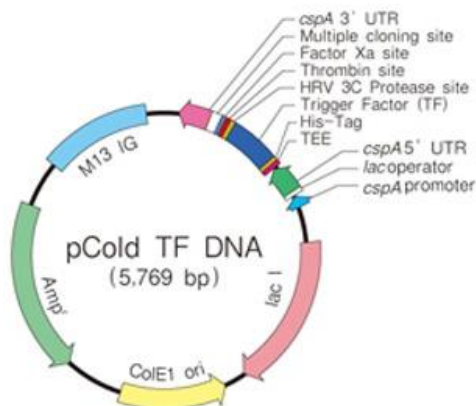


图 1 pCold TF DNA 载体图谱

GenBank 登录号：AB213654

● **保存:** -20°C

*自收到之日起, 适当条件下保存, 两年内有效。

● **使用方法**

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。

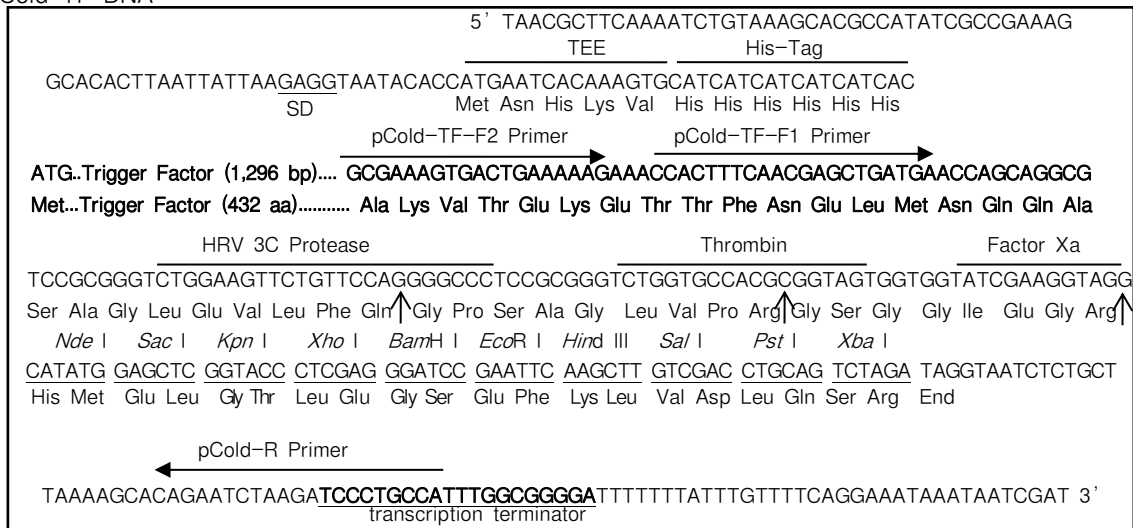
- (1) 在冷休克表达载体 pCold TF DNA 多克隆位点处插入目的基因, 制备表达载体。
- (2) 用构建的表达载体转化大肠杆菌(如 BL21) 宿主, 在含有 Amp 的 LB 培养基平板上筛选转化子。
- (3) 接种转化子到含有 50 μg/ml Amp 的 LB 培养液, 37°C 振荡培养。
- (4) 当培养液的 OD₆₀₀=0.4-0.5 时, 立即将培养液移至 15°C 放置 30 分钟。
- (5) 添加 IPTG 到终浓度 0.1-1.0 mM, 15°C 培养 24 小时。
- (6) 培养完成后, 利用 SDS-PAGE 和活性测定确认目的产物的有无、表达量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

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。

此外, His tag 可以用于精制融合蛋白质, N 末端的标签序列可以使用 Factor Xa、Thrombin、HRV 3C Protease 切断、除去。

● **多克隆位点图谱**

pCold TF DNA



● **实验例**

使用 pCold TF DNA 与(1)单独 pCold I DNA、(2) pCold I DNA + 伴侣蛋白质粒 pTf16 和(3)一个含有其他蛋白质标签的 T7 启动子表达系统进行蛋白表达比较。将 pCold I DNA 和 pCold TF DNA 分别转化 *E. coli* BL21, 根据各自的操作方法进行目的基因的表达。T7 启动子表达系统通常的方法为添加 IPTG 后 37°C 培养。

(1) 蛋白质可溶性表达的实验例

蛋白酶 A (推测分子量 29 kDa), 在 pCold I DNA (单独表达和伴侣蛋白共表达) 和 T7 启动子表达系统中, 在目的蛋白质的推测分子量为 29 kDa 附近没有明显的蛋白质条带, 另一方面, 在使用 pCold TF DNA 时, 检测到目的蛋白质 (81 kDa=29 kDa + 52 kDa) 的表达, 大部分是可溶性的, 并且融合蛋白中的蛋白酶 A 仍具有活性。(图 2)

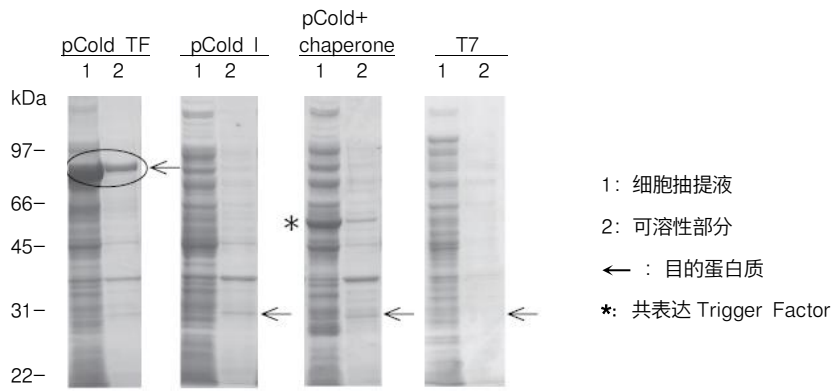


图 2 蛋白酶 A 的表达

(2) 蛋白质可溶性表达量增大的实验例

蛋白酶 B (推测分子量约 63 kDa) 在 pCold I DNA (单独表达和伴侣蛋白共表达) 和其它的带有可溶性标签的 T7 启动子表达系统中 (Trx Tag [~12 kDa], Nus Tag [~55 kDa] 和 GST Tag [~26 kDa]), 很少有可溶性目的蛋白质的表达。另一方面, 在使用 pCold TF DNA 时, 经确认, 表达的目的蛋白质大部分都是可溶性的, 并且其表达水平比其他的高很多。(因为蛋白质标签的融合表达, 所以所得的表达产物的分子量比目的蛋白质的大)。(图 3)

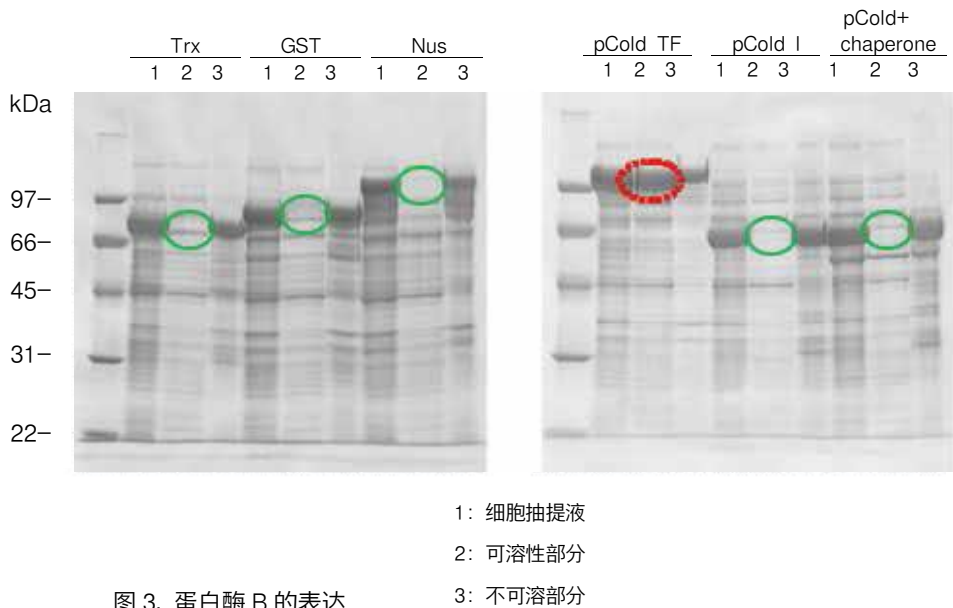


图 3. 蛋白酶 B 的表达

● Q&A

Q1. 表达蛋白质不可溶时, 如何研讨?

A1. 不同目的蛋白质的最适培养、诱导条件各不相同。培养、诱导条件和使用的大肠杆菌宿主、提取方法等参考以下事项进行研讨。

- 调整诱导时间 (研讨从对数期初期到末期之间的时间)
- 调整诱导剂 IPTG 的浓度 (0.1~1.0 mM)。
- 研讨诱导后的培养时间 (通常 15°C, 24 小时最合适)
- 改变通气与搅拌条件

- Q2. 完全不表达或者表达量很少时，如何研讨？
A2. 研讨培养与诱导条件（参考Q1），或者更换宿主大肠杆菌。
- Q3. 迄今为止，使用过的大肠杆菌宿主有哪些？
A3. 使用过Merck Millipore 公司的BL21、Rosetta、Origami 等。BL21是最常用的表达宿主。Origami是 *trx/gor* 基因缺陷型菌株，可以在细胞质中高水平地形成二硫键，因此可以促进表达蛋白质的可溶性和再折叠。Rosetta™则是包含一种质粒，可以表达大肠杆菌稀有密码子相应的tRNA，能使那些因为大肠杆菌密码子使用受限的基因获得正常的表达。
- Q4. 在pCold TF DNA中插入目的基因的质粒转化到大肠杆菌后，其平板可以4℃保存吗？
A4. 不推荐4℃保存平板。插入目的基因的pCold TF DNA转化到大肠杆菌后，应当尽早制备成甘油保存样，-80℃保存。
- Q5. 可以表达的蛋白质分子量是多少？
A5. 有表达实例，人源基因125 kDa的蛋白质有很好的可溶性（CBB染色，可以检测到125+52 kDa条带）。
- A6. 在蛋白酶消化后，SDS-PAGE确认表达的蛋白质已经被切断，为什么TF-tag蛋白质还是不能与目的蛋白质分离？
Q6. 根据目的蛋白质的特性，目的蛋白质和TF-tag蛋白质即使在蛋白酶消化后仍可能相互作用；蛋白质可溶性低时，这种相互作用的趋势较强。
解决方案：在蛋白酶切断时添加一些能够有效改善溶解度的试剂，例如：1% Triton X-100, 0.5 M arginine, 5 mM DTT或20 mM CHAPS等，但是没有通用的条件，所以必须研讨提高可溶性的条件。但是，有的目的蛋白质与TF tag的相互作用极强，复合物不能被分开。当遇到目的蛋白质不能被单独分离的情况时，推荐使用pCold ProS2 DNA (Code No. 3371)，因为pCold ProS2 DNA带有Protein S由来的ProS2可溶性标签，ProS2 tag与目的蛋白质的相互作用弱，蛋白酶处理后，目的蛋白质与ProS2 tag的分离比较容易。
- Q7. 利用pCold TF表达的蛋白质制备抗体时应注意哪几点？
A7. 当兔子对TF融合蛋白质有免疫应答时，一般情况下抗血清中显示很强的TF抗原性，如果要提高TF tag融合蛋白的抗体性能时，推荐使用天竺鼠作为宿主。当对兔子进行免疫时，建议利用蛋白酶切断TF tag融合蛋白，精制不含有TF tag的目的蛋白质，然后用精制好的目的蛋白质制备抗体。

● 附录

表达质粒的构建——以硫氧还蛋白基因为例

1. pCold TF表达载体的构建概述

- (1) 根据编码目的蛋白质的DNA片段在pCold TF DNA的阅读框中选择合适的限制酶酶切位点。
- (2) 编码目的蛋白质DNA片段的制备。
- (3) 限制酶消化载体。
- (4) 消化的载体和DNA片段连接后，转化到适当的大肠杆菌中。
- (5) 利用得到的克隆子制备质粒，筛选出正确插入DNA片段的质粒。
- (6) 将纯化得到的质粒用于表达实验。

DNA片段制备方法有PCR方法、通过限制酶消化质粒切出目的基因和全基因合成等方法。如果目的基因没有合适的限制酶酶切位点，可以使用In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech Lab., Inc.)快速方便地直接进行定向克隆。因为pCold TF DNA的多克隆位点与pCold I-IV的一样，所以克隆到pCold I-IV的外源片段可以很容易地替换到pCold TF DNA中。

以下是通过PCR方法的一般克隆实验例。

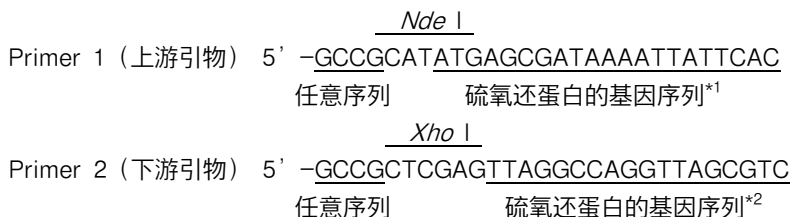
2. 大肠杆菌硫氧还蛋白表达质粒的制备

(1) 引物设计说明 (引物设计方法及注意事项)

- ① 在多克隆位点上选择2种不能切断目的基因序列的限制酶。
- ② 设计目的基因的引物时, 应在引物的5' 端添加①中所选择的酶切位点。调整插入的DNA片段和限制酶酶切位点之间的碱基数, 以便DNA片段的读码框与pCold TF DNA N末端的读码框相吻合。最好在终止密码子后直接插入一个限制酶酶切位点。
- ③ 在限制酶酶切位点外侧任意增加4个或更多的碱基。因为大多数的限制酶需要在其酶切位点外侧添加保护碱基以提高酶切效率。如果没有这几个碱基, 酶切效率会比较差。

[引物设计例]

在pCold TF DNA 的MCS的*Nde* I/*Xho* I位点插入:



*1: 应用*Nde* I酶切位点时, 应调整硫氧还蛋白基因起始密码子ATG的位置与*Nde* I的ATG的位置一致。

*2: 含有终止密码子的硫氧还蛋白基因的互补链。

(2) Insert DNA的制备:

[PCR扩增硫氧还蛋白的目的基因 (约350 bp) 实验例]

① PCR扩增目的基因

按如下成分配制反应混合液 (建议使用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 HS DNA Polymerase (5 U/μl)	0.5 μl
灭菌水	32.5 μl
Total	50 μl

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

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

② 确认扩增产物

取 PCR 反应液 5 μl 电泳, 确认扩增片段条带单一、正确。

③ 纯化扩增产物

扩增产物为单一条带时, 建议使用酚/氯仿抽提处理除去 PrimeSTAR HS DNA Polymerase。扩增产物为多条带时, 需进行 Agarose 凝胶回收, 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。

④ 限制酶消化扩增产物

使用 *Nde* I 和 *Xho* I 消化精制后的 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
<hr/>	
Total	30 μl

b. 37°C 反应 1 小时。

c. 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，需要对反应液进行酚处理。此外，也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 的 100% 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，弃上清液。
- ④ 加入 70% 冷乙醇，4°C，12,000 rpm 离心 5 分钟。
- ⑤ 弃上清液，自然干燥。
- ⑥ 加入 10–50 μl 的 TE buffer，溶解 DNA。

(3) 限制酶消化 pCold TF DNA

使用与消化扩增片段相同的限制酶消化冷休克载体 pCold TF DNA，然后精制。精制后的 DNA 用 TE buffer 溶解，测定吸光度，计算 DNA 浓度。

① 按如下成分配制反应液

pCold TF DNA	1 μg
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	X μl
<hr/>	
Total	30 μl

② 37°C 反应 1–2 小时

③ 乙醇沉淀，回收载体 DNA。*

④ 用适当 TE buffer 溶解。

⑤ 测定吸光度 (OD₂₆₀)，计算 DNA 浓度。dsDNA: 1 OD₂₆₀ = 50 μg /ml。

⑥ 调整 DNA 浓度到 100 ng/μl。

*: 限制酶消化后，使用 Alkaline Phosphatase (*E. coli* C75) (Code No. 2120A)、CIAP (Code No. 2250A) 对载体 DNA 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。建议完全除去酶切产生的小片段 DNA，可以使用琼脂糖凝胶电泳，然后切胶回收纯化的载体 DNA。

(4) DNA 片段插入 pCold TF 载体后转化

① 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. 6023A) 进行连接反应。我们推荐载体和插入片段的摩尔比为 1:3~1:10。

在冰上配制连接反应液:

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

16°C反应 1 小时。

② 转化

- E. coli* HST08 Premium Competent Cells(Code No. 9128)使用前冰中融解。
- 连接反应液 10 μ l 全量加至 100 μ l Competent Cells 中。
- 冰中放置 30 分钟。
- 42°C加热 45 秒钟后。
- 在冰中放置 1–2 分钟。
- 加入 37°C温育的 SOC 培养基至终体积为 1 ml。
- 37°C振荡培养 60 分钟。
- 在含有 Amp (100 μ g/ml) 的 L-琼脂平板培养基上 37°C过夜培养, 形成单菌落。

(5) 质粒的制备与确认

(4)–②所得克隆接种到适量的含有 Amp (100 μ g/ml) 的 LB 培养液中, 37°C过夜培养, 然后提取质粒。

使用 *Nde*I 和 *Xho*I 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 时, 还需测序确认 DNA 片段的序列, 含正确序列 DNA 的质粒可以作表达载体使用。测序时使用引物如下所示:

上游引物 pCold-TF-F1 : 5' – CCACTTTCAACGAGCTGATG
pCold-TF-F2 : 5' – GCGAAAGTGACTGAAAAAG
下游引物 pCold-R : 5' –GGCAGGGATCTTAGATTCTG

● 参考文献

- 1) Qing G., *et al. Nature Biotechnology* . (2004) **22**: 877–882.
- 2) Gerlined S., *et al. EMBO J* . (1995) **14**: 4939–4948.

● 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 Series (Code No. 3360 – 3364)

pCold™ ProS2 DNA (Code No. 3371)

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 DH5α Competent Cells (Code No. 9057)

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

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

E. coli DH5α 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>