

蛋白质可溶性表达的可靠选择—— 冷休克表达系统

产品指南

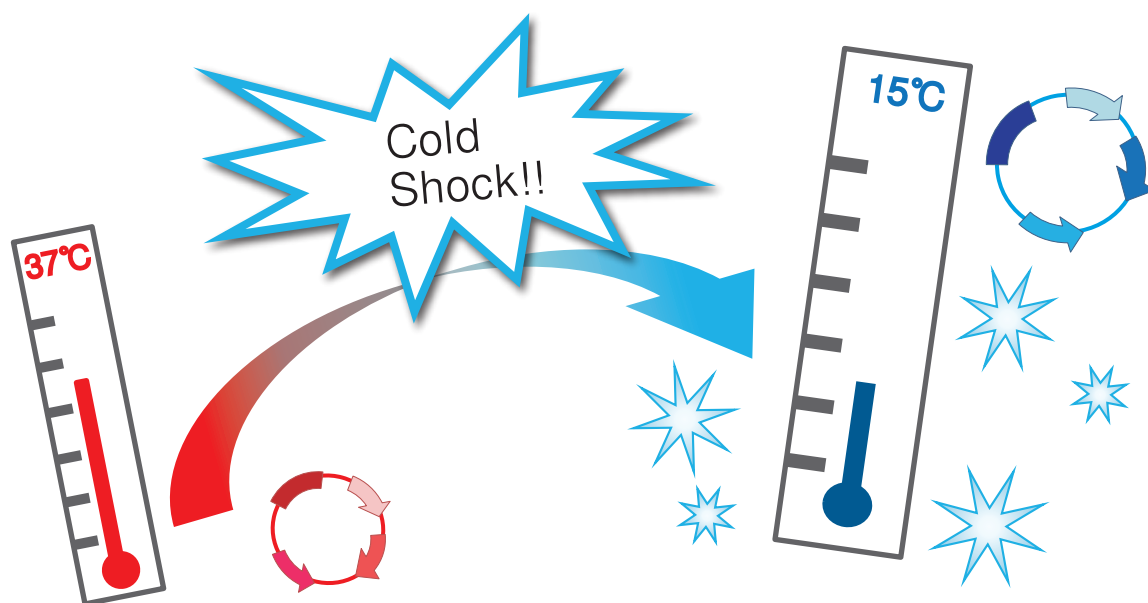
蛋白质不表达？

蛋白质不可溶？

受此困扰的您值得一看！

大肠杆菌冷休克表达系统有哪些优点？

- ★可以使用广泛的大肠杆菌作为宿主
- ★仅需将培养液冷却至15℃即可高效诱导表达
- ★可根据使用目的选择可溶性标签的种类及有无His-tag
- ★同以往的大肠杆菌表达系统相比，可提高生产效率和可溶性表达

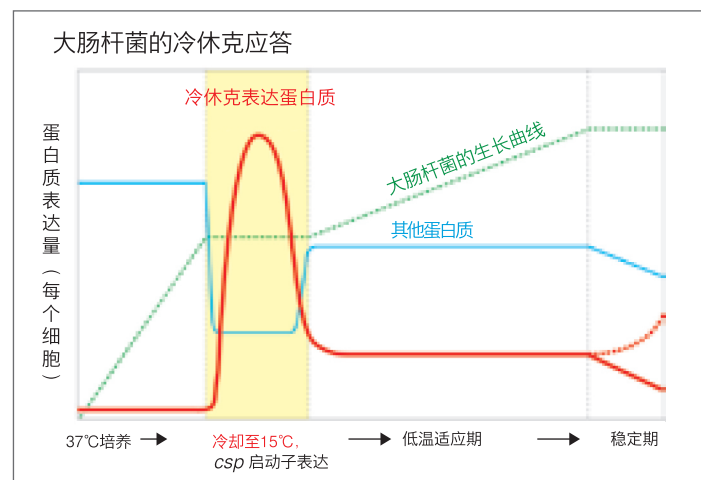


更多实验例及客户反馈参见P4~P6

冷休克表达系统

大肠杆菌冷休克表达系统是……

将37°C培养的大肠杆菌在低温下培养时，大肠杆菌的生长会暂时停止，此时，大部分蛋白质的表达会减少，但一类被称为冷休克蛋白质的CSPs蛋白质会特异性增加。围绕这一机制，Takara Bio公司与井上正顺教授(University of Medicine and Dentistry of New Jersey, USA)共同开发了冷休克表达载体pCold™系列。同以往的大肠杆菌表达系统相比，可高效获得高纯度的目的蛋白质。



冷休克表达的标准操作流程

在pCold™载体的多克隆位点处插入目的基因，制备表达载体。

↓
表达载体转化大肠杆菌后，在含有Amp的LB培养基平板上筛选转化子。

↓
将转化子接种到含有50–100 μg/ml Amp的LB培养液中，37°C振荡培养。

↓
当培养液的OD₆₀₀达到0.4–0.5时，迅速冷却至15°C，静置30分钟。

↓
加入IPTG，使其终浓度为0.1–1.0 mM，15°C振荡培养24小时。

↓
收集菌体

※目的蛋白质不同，其最佳培养、诱导条件（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）会有所不同，所以必要时请研讨目的蛋白质的最佳培养条件和诱导条件。

冷休克表达的3个优点

◆ 背景低，可进行高效表达

低温培养时夹杂的蛋白酶活性低，同时大肠杆菌来源蛋白质的表达偏低，所以可获得未降解的完整的目的蛋白质，且回收率高，新生蛋白质高达90%。因此，目的蛋白质的纯化更简单，同时可利用同位素进行高效的标记（图1）。

◆ 提高可溶性表达

可溶性表达可以使目的蛋白质缓慢地形成立体结构。当使用以往的T7蛋白质表达系统出现蛋白质不表达或不溶性表达时，使用冷休克表达系统可改善目的蛋白质的表达及可溶性（图2、3）。同时使用Chaperone competent cells 和 chaperone plasmid 可进一步提高蛋白质的可溶性表达。

◆ 可使用广泛的大肠杆菌作为宿主

因为应用了大肠杆菌来源的*cspA*启动子进行转录，所以可以使用绝大部分的大肠杆菌作为宿主。

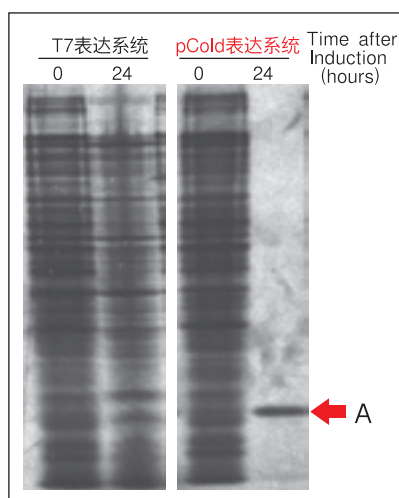


图1. 脉冲标记实验例
人源基因A（约12 kDa）

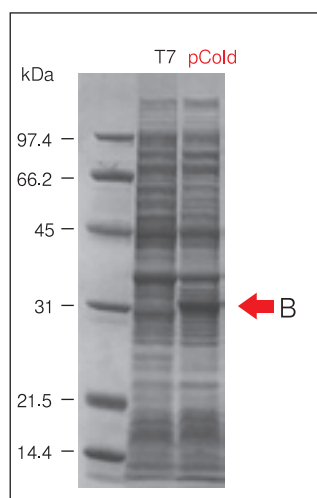


图2. 表达可能性实验例
人源基因B（约31 kDa）
（总蛋白质CBB染色）

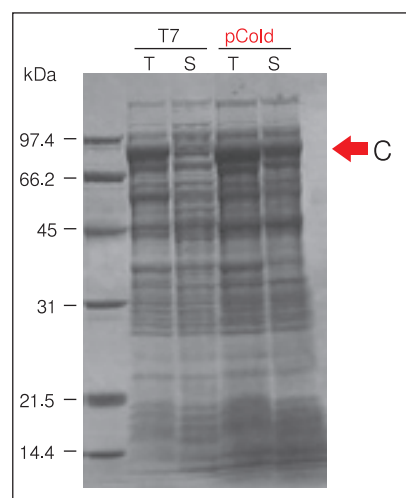


图3. 可溶性表达量增大实验例
人源基因C（约80 kDa）
（T：总蛋白质 S：可溶性蛋白质）

冷休克表达载体制品

请根据使用目的选择可溶性蛋白质标签的种类和His-Tag的有无

产品名称	GenBank Accession No.	可溶性标签	His-Tag	用于切割标签的酶	翻译增强元件 (TEE)
pCold™ GST DNA	—	GST	●	Factor Xa (※1)、HRV 3C Protease (※2)	●
pCold™ ProS2 DNA	—	ProS2 (Protein S)	●	HRV 3C Protease (※2)、Thrombin (※2)、Factor Xa (※2)	●
pCold™ TF DNA	AB213654	TF (Trigger Factor)	●	HRV 3C Protease (※2)、Thrombin (※2)、Factor Xa (※2)	●
pCold™ I DNA	AB186388	—	●	Factor Xa (※1)	●
pCold™ II DNA	AB186389	—	●	—	●
pCold™ III DNA	AB186390	—	—	—	●
pCold™ IV DNA	AB186391	—	—	—	—

※1: 去除His-Tag序列 ※2: 去除His-Tag及可溶性标签序列



冷休克表达载体的使用区别是？

- 如果使用带有His标签序列的载体，可以利用亲和层析的方法纯化目的蛋白质。
- 如果不希望目的蛋白质N末端附加多余的氨基酸序列，建议使用可用Factor Xa切断标签序列的pCold I DNA，或者使用不含翻译增强元件（TEE）和标签序列的pCold IV DNA。
- 使用pCold I-IV DNA时，如果出现目的蛋白质不表达或不溶性表达，请尝试使用融合表达可溶性标签的pCold TF DNA、pCold ProS2 DNA、pCold GST DNA。

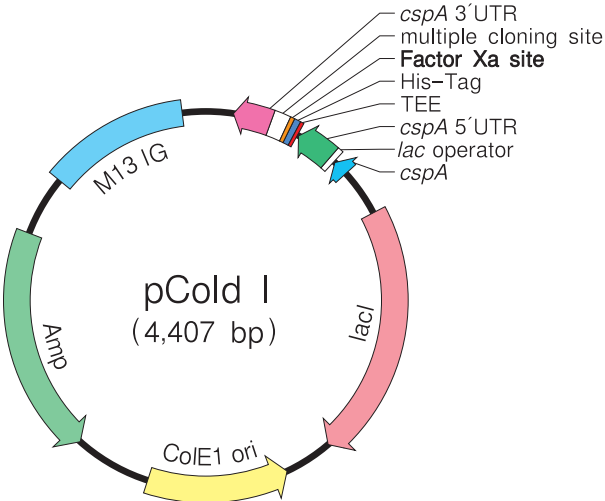
冷休克表达载体制品介绍

▼ 不含可溶性标签的基本型载体

pCold™ I~IV DNA
(Code No. 3361~3364)

特 点

- 表达效率高：
目的蛋白质表达量最高可达大肠杆菌宿主蛋白质的60%。
- 表达准确率提高：
很多在T7系统中不表达的蛋白质可能表达。
- 可溶性表达增加：
很多在T7系统中不溶性表达的蛋白质可能实现可溶性表达。 (*3)
- 便于进行同位素标记：
目的蛋白质、新生蛋白质高达90%，可以进行有效标记。
- 可使用的宿主范围广：
因为应用了大肠杆菌来源的cspA启动子进行转录，所以大部分大肠杆菌都可以作为宿主使用。



※3: 同时使用Chaperone Competent Cells BL21系列 (Code No. 9120~9125) 和Chaperone Plasmid Set (Code No. 3340) 可进一步提高目的蛋白质的可溶性表达。

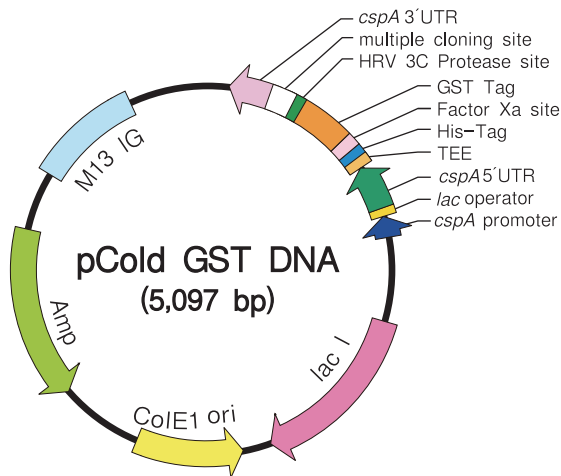
含有可溶性标签的载体

融合表达GST标签的载体

pCold™ GST DNA (Code No. 3372)

特 点

- 即使不进行表达条件的优化，也可实现目的蛋白质高溶解度的表达
- 可以进行GST亲和纯化、His标签纯化，并且可以将标签切断

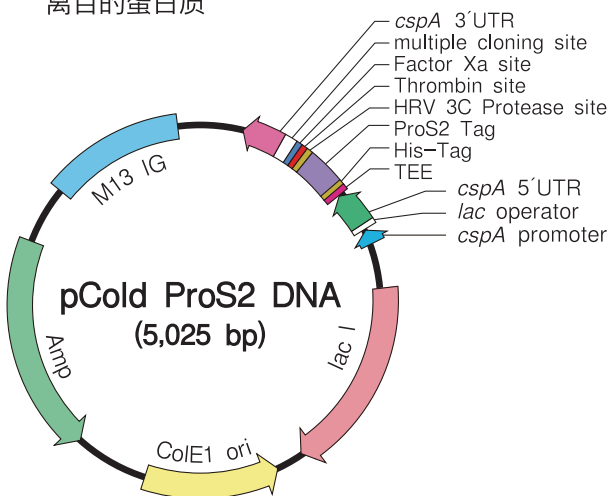


融合表达ProS2标签的载体

pCold™ ProS2 DNA (Code No. 3371)

特 点

- 通过融合表达ProS2标签，可提高目的蛋白质的可溶性
- 可利用His标签进行纯化，并且可以将可溶性标签切断
- ProS2标签与目的蛋白质的相互作用很弱，可以有效的分离目的蛋白质



pCold Q & A

- Q. pCold™载体适合表达的蛋白质分子量是多少？
A. 从几kDa到100 kDa的蛋白质都可以表达。
- Q. 已经表达过哪些物种的基因？
A. 大肠杆菌、嗜热菌、超嗜热菌、人、小鼠、植物等。
- Q. 1 L培养基的蛋白质表达量有多少？
A. 根据目的基因的不同，通常能有几mg~几十mg/L的表达量。
可以进行小规模表达测试，利用粗提液进行SDS电泳，然后通过CBB染色确认蛋白质的表达，如果有一定水平的表达，那么3 L培养基可以纯化回收得到mg级的蛋白质。

★ 更多Q&A内容请见制品说明书！

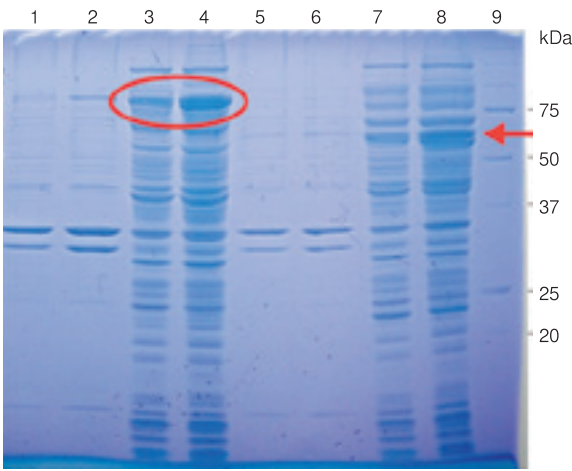
【冷休克表达载体制品列表】

产品名称	包装量	Code No.
pCold™ GST DNA	25 μg	3372
pCold™ ProS2 DNA	25 μg	3371
pCold™ TF DNA	25 μg	3365
pCold™ I DNA	25 μg	3361
pCold™ II DNA	25 μg	3362
pCold™ III DNA	25 μg	3363
pCold™ IV DNA	25 μg	3364
pCold™ Vector Set	pCold™ I ~ IV DNA各5 μg	3360

融合GST与植物蛋白质的表达

【方法】
接种菌株到3 ml的LB培养基中（+Amp），过夜培养。取出部分菌液加入到30 ml的LB培养基（+Amp），37℃振荡培养约2小时（至OD₆₀₀=0.5左右），将培养液移入15℃的水槽中，静置30分钟冷却。
加入0.1 M IPTG（终浓度0.1 mM），15℃振荡培养一定时间（4小时和24小时），诱导目的蛋白质表达。
取3 ml菌液，离心收集菌体，加入300 μl的1xPBS重悬菌体，进行超声破碎处理，然后在4℃条件下15,000 rpm离心10 min，得上清和沉淀，再通过SDS-PAGE对沉淀（不溶性部分）和上清（可溶性部分）进行分析，确认诱导表达的效果和目的蛋白质的可溶性。

Lane No	表达蛋白质	部分	诱导时间
1	GST-Full (全长)	不溶性	4 hr
2			24 hr
3		可溶性	4 hr
4			24 hr
5	GST-Nt (N末端侧)	不溶性	4 hr
6			24 hr
7		可溶性	4 hr
8			24 hr
9	Marker		



【结果】
使用pCold GST可诱导表达全长的蛋白质（Lane1~4）和蛋白质的N末端片段（Lane5~8）。另外，改变添加IPTG后的诱导时间为4小时和24小时，蛋白质均可被诱导表达。
分子量约为50 kDa的目的蛋白质与GST融合蛋白质融合表达，因为二者作为全长蛋白质表达，条带出现在75 kDa附近。在诱导24小时的结果中，不溶性部分可以看到微弱的条带，但是大多数可以在可溶性部分回收得到。（Lane3、4）
N末端片段与GST融合表达的蛋白质，也可以在可溶性部分的60 kDa附近确认到条带（Lane7、8）。

用户comment

Q. 为什么选择使用本制品？
A. 我们使用过融合表达GST的pGEX等其他载体，但仍然会产生不溶性表达，考虑到是否需要低温诱导这样的改善，因此购买了本制品。

Q. 实际使用效果如何？
A. 在其他载体中不溶性表达的蛋白质，可以在pCold载体中作为可溶性部分回收获得，这对整个研究进展十分有利。

pCold™ ProS2和pCold™ GST的比较

【方法】
表达细菌来源的目的蛋白质，进行超声破碎，离心后分别对上清和沉淀进行电泳检测。

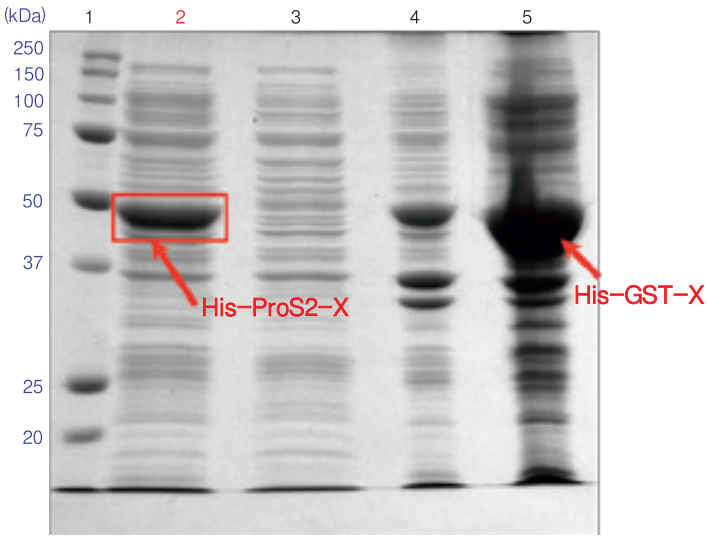
- 1: Marker
- 2: sup pCold ProS2-X
- 3: sup pCold GST-X
- 4: ppt pCold ProS2-X
- 5: ppt pCold GST-X

【结果】
使用GST标签不可溶表达的蛋白质，在使用ProS2标签后可溶表达。

用户comment

Q. 为什么选择使用本制品？
A. 因为细菌蛋白质的可溶性较差。

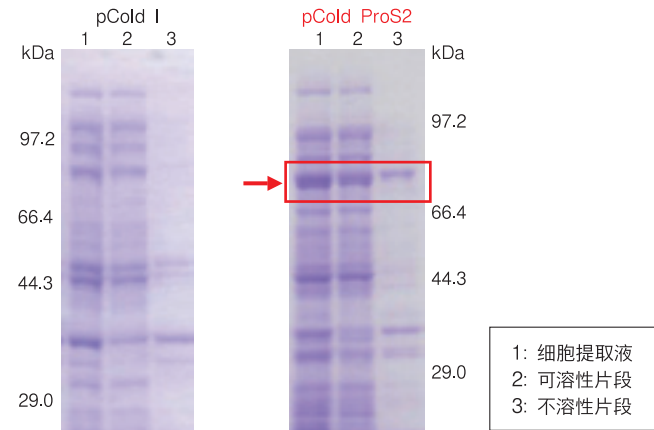
Q. 实际使用效果如何？
A. 表达后的蛋白质可溶性显著提高，可以进行大量纯化。



▼ pCold™ ProS2与pCold™ I表达量和表达产物可溶性的比较

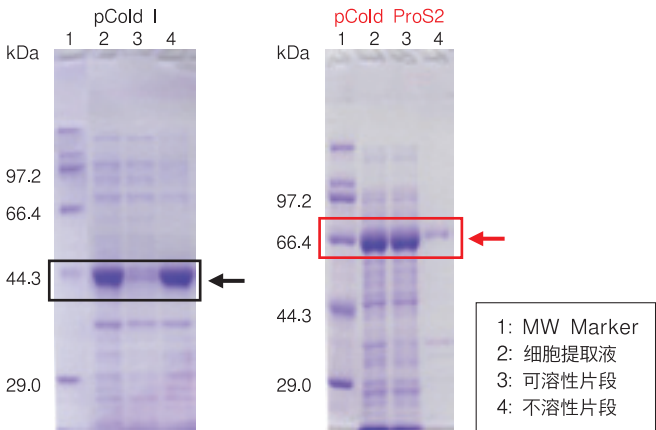
【方法】比较单独使用pCold ProS2 DNA和pCold I DNA表达系统的蛋白质表达量和可溶性。宿主选择BL21，培养和诱导表达均按照标准流程进行操作。

<可溶性蛋白质表达实验例>



【结果】使用pCold I DNA表达，没有检测到酶蛋白D（推测分子量为52.4 kDa）的清晰条带。但是，使用pCold ProS2 DNA表达，检测到大小约为75 kDa的目的蛋白质（52.4 kDa +23 kDa标签）条带，并且大部分都是可溶性的。

<可溶性表达量增大实验例>



【结果】使用pCold I DNA表达，没有检测到蛋白质E（推测分子量为43.3 kDa）的清晰条带。但是，使用pCold ProS2 DNA表达，检测到大小约为66 kDa的目的蛋白质（43.3 kDa +23 kDa标签）条带，并且大部分都是可溶性的。

▼ GST-envZB融合蛋白质（约46.3 kDa）的表达、纯化以及标签去除

① 表达和纯化

【方法】将envZB基因序列（162aa）插入到pCold GST DNA中，转化到TaKaRa Competent Cells BL21（Code No. 9126）中，进行诱导表达。破碎菌体后离心分离得到可溶性和不可溶性部分，使用GST标签蛋白质纯化树脂Glutathione-Superflow Resin（Code No. 635607）对可溶性部分进行纯化。使用含33 mM还原型谷胱甘肽的50 mM Tris-HCl, pH8.0进行洗脱，对各部分进行SDS-PAGE电泳并做CBB染色。

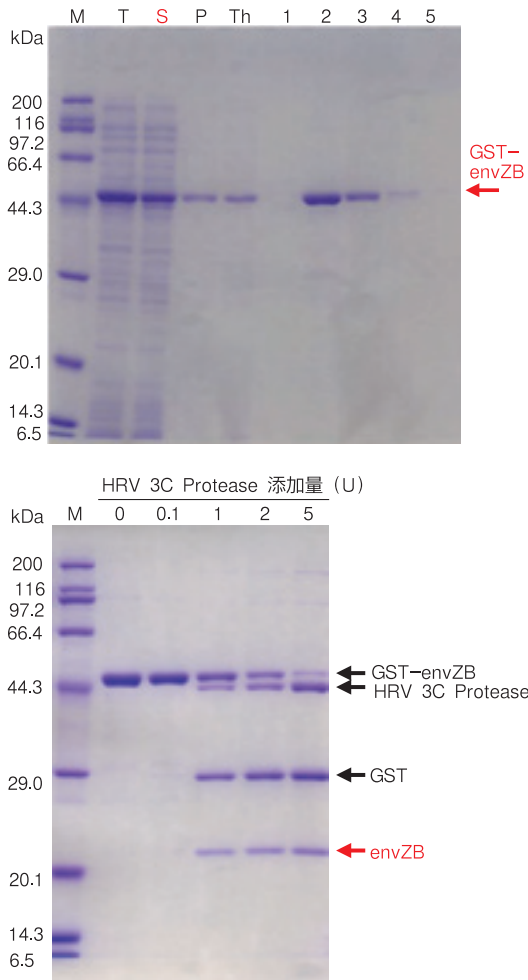
M: Protein Molecular Weight Marker (Broad) (Code No. 3452)
T: 细胞裂解液
S: 细胞裂解液可溶性片段
P: 细胞裂解液不溶性片段
Th: Glutathione-Superflow树脂穿透流出液
1~5: Glutathione-Superflow树脂洗脱组分1~5

【结果】GST融合蛋白质高表达，并且大部分是可溶性的。另外，使用亲和层析纯化，可以得到高纯度产物。

② 标签去除

【方法】取5 μg ①中表达纯化的GST-envZB融合蛋白质，加入HRV 3C Protease（分别添加0.1 U、1 U、2 U、5 U）进行消化处理，去除GST标签。4℃反应16小时后，对各反应液进行SDS-PAGE检测及CBB染色。

【结果】随着HRV 3C Protease量的增加，GST-envZB的切断效率也相应提高，并且目的蛋白质envZB的量也随之增加。



用户反馈介绍

“用户反馈”来自于实际使用过pCold™载体的用户，我们选取其中的一部分进行介绍，以供还未使用或正在考虑中的用户参考。



◆K研究所 M老师 (pCold ProS2 DNA)

Q1 为什么选择使用本制品？

使用其他方法的话，蛋白质表达量低，对此一直很困扰，于是被同事推荐本制品。

Q2 实际使用效果如何？

在其他表达系统中表达不好的蛋白质，现在可以很好地表达。我想是因为在低温条件下，大肠杆菌中其他蛋白质的量相对减少，这对重组蛋白质的表达很有利。

Q3 您想对还没有使用过的研究人员说什么？

如果需要多种多克隆位点并获得大量的重组蛋白质，可以尝试这个表达系统。

◆T大学 S老师 (pCold GST DNA)

Q1 为什么选择使用本制品？

因为这是可以使用 *Xho*、*Nde* 内切酶并且带GST标签的载体。

Q2 实际使用效果如何？

凝胶回收、构建插入目的基因的表达式过程十分顺利，表达可以通过温度控制来进行一定程度的调整，十分方便。

Q3 您想对还没有使用过的研究人员说什么？

有多种多克隆位点和两个标签，可以通过控制温度调节表达，是一款通用性很强的产品。如果应用环境合适，它可以满足多种不同的实验要求，非常方便。

◆H大学 K老师 (pCold TF DNA)

Q1 为什么选择使用本制品？

一直在研究如何改善重组蛋白质的可溶性，作为备选方案之一，使用了本产品。

Q2 实际使用效果如何？

所检测的大部分蛋白质在带有标签的情况下均能够可溶性表达，的确是个非常优秀的表达系统。

Q3 您想对还没有使用过的研究人员说什么？

当重组蛋白质的可溶性表达出现困难时，本系统是首选。

◆K大学 N老师 (pCold Vector Set)

Q1 为什么选择使用本制品？

虽然使用过多种载体进行表达实验，但仍很难获得可溶性蛋白质，这让我很困扰。

Q2 实际使用效果如何？

超出预期。

Q3 您想对还没有使用过的研究人员说什么？

虽然获得表达蛋白质需要多等一天，但如果这个等待能够达到你期望的结果，那么还是值得的。

◆R研究所 S老师 (pCold GST DNA)

Q1 为什么选择使用本制品？

在纯化某种蛋白质的时候，可溶性较低，这样就不能纯化所需要的蛋白质。

Q2 实际使用效果如何？

目的蛋白质的可溶性有很大改善，因为同时带有GST标签和His标签，所以不需要对质粒进行改造即可在变性条件下进行纯化，工作效率得到提高。

Q3 您想对还没有使用过的研究人员说什么？

实验就是不断探索的过程，如果遇到困难，要勇于尝试不同的方法，问题很可能就迎刃而解了！

◆S大学 T老师 (pCold I DNA)

Q1 为什么选择使用本制品？

想建立大肠杆菌的蛋白质表达系统。

Q2 实际使用效果如何？

有成功表达的蛋白质，也有不能表达的蛋白质。成功表达的比较稳定，即使对标准操作流程做一些改动，也可以得到目的蛋白质。

Q3 您想对还没有使用过的研究人员说什么？

使用起来非常方便、简单。



更多使用案例详见Takara Bio官方网站<http://www.takara-bio.co.jp/>。

注：本资料中所有客户信息实验结果及反馈均来自Takara Bio Inc.

冷休克表达系统<关联制品>

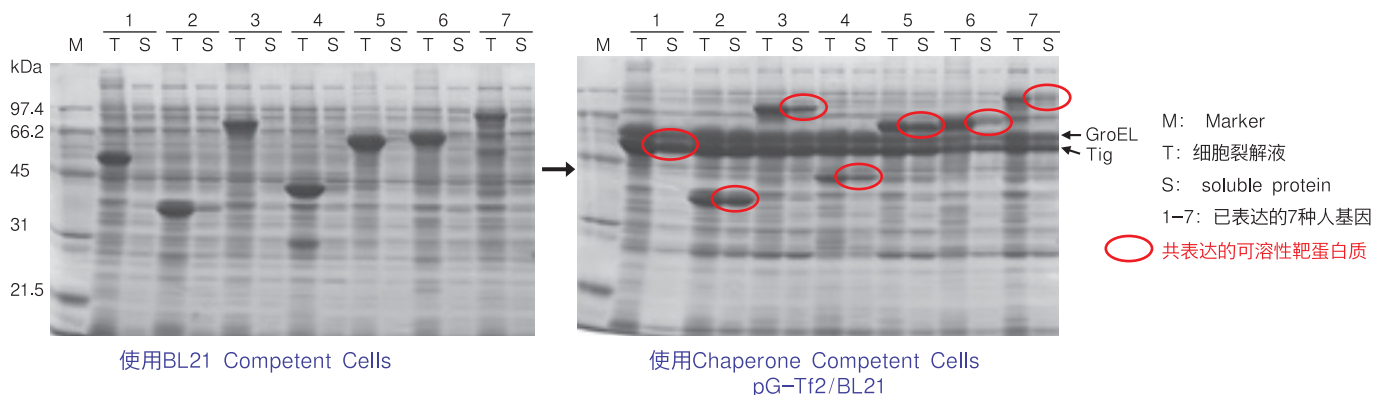
●共表达分子伴侣的感受态细胞

本制品是转化了伴侣蛋白质质粒的大肠杆菌BL21感受态细胞。与冷休克表达载体配套使用，可有效促进蛋白质的可溶性表达。

※每种感受态细胞也可单独销售，详情参见网站或产品目录<http://www.takarabiomed.com.cn/>。

产品名称	包装量	Code No.
Chaperone Competent Cells BL21 Set	100 μ l $\times$ 3 $\times$ 6种	9120

▼单独使用pCold™ I表达的不溶性靶蛋白质，在与伴侣质粒共表达后，可溶性显著提高。



●用于切断标签的酶

产品名称	包装量	Code No.
HRV 3C Protease	500 U	7360

●常见的纯化树脂

产品名称	包装量	Code No.
Glutathione-Superflow™ Resin	10 ml	635607
His60 Ni Superflow™ Resin	25 ml	635660
TALON® Metal Affinity Resin	25 ml	635502

●膜技术小量快速纯化 (5~15 min)

产品名称	包装量	Code No.
Capturem™ His-Tagged Purification Miniprep Kit	20 次	635710
Capturem™ His-Tagged Purification Maxiprep Kit	6 次	635713
Capturem™ His-Tagged Purification 96	96 well plate	635714

- 本宣传页上登载的制品，都是以科研为目的。请不要用于其它方面，如：不要用于人、动物的临床诊断和治疗。也不能用于食品、化妆品及家庭用品等方面。
- 未经本公司许可，严禁产品的转售·转让、以转售·转让为目的的产品更改、以及用于商品的制造。
- 专利许可信息请在本公司网站上确认：<http://www.takarabiomed.com.cn/>。
- 本宣传页上登载的公司名称及制品名称即使没有特殊标注，使用的也是各公司的商标或注册商标。
- 本宣传页仅限于中国大陆地区客户使用，其他地区客户请咨询当地代理商。
- 本宣传页上记载的产品信息是2019年9月1日的信息，最新信息请参考公司官网。

宝日医生物技术（北京）有限公司
Takara Biomedical Technology (Beijing) Co.,Ltd.

技术咨询电话：4006518761 4006518769
E-mail: service@takarabiomed.com.cn

Ver.2 2019年9月印刷 2K



www.takarabiomed.com.cn