

Code No. 3366–3370

研究用

TaKaRa

SPP System™ Set	(Code No. 3366)
SPP System™ I	(Code No. 3367)
SPP System™ II	(Code No. 3368)
SPP System™ III	(Code No. 3369)
SPP System™ IV	(Code No. 3370)

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 载体图谱	2
● 贮存溶液	3
● 纯 度	3
● 保 存	3
● 使用方法	3
● pCold I-IV (SP4) DNA 的多克隆位点图谱	4
● 实验例	6
● Q&A	7
● 参考文献	8
● 关联产品	8

● 制品说明

根据美国新泽西州医学与牙科大学的井上正顺博士小组的研究, 大肠杆菌的蛋白质 MazF 是一种能够识别并切断单链 RNA 特定序列 (ACA) 的核酸内切酶 (mRNA Interferase)。利用 MazF 可以抑制宿主蛋白质的表达, 而只表达目的蛋白质。利用这一技术, 开发了 Single Protein Production (SPP) System。

在 SPP System 中, 在保持氨基酸序列不变的情况下用非 ACA 序列置换目的基因中的 ACA 序列, 然后与 MazF 基因共表达。大部分宿主蛋白的 mRNA 因为有 ACA 序列而被 MazF 分解, 表达被抑制, 但是目的基因的转录 mRNA 中不含有 ACA 序列, 不能被 MazF 切断, 从而使目的蛋白得到高效表达。由于目的蛋白质的不同, 也有比单纯使用冷休克表达载体进行表达时表达量低的情况。构建 SPP 系统, 首先需要通过化学合成或点突变的方法制备无 ACA 序列的目的基因。设计无 ACA 基因的时候, 在确保氨基酸序列不变的情况下将 ACA 序列替换, 同时加入必须的酶切位点。其次, 将无 ACA 基因克隆至含有无 ACA 转录区域的 pCold (SP-4) 载体中。至此, 用于目的片段的 SPP 系统表达的载体准备完毕, 将其与能够表达足量的 MazF 的 pMazF (图 3) 载体共转化至 *E. coli* 中, 形成了目的片段的 SPP。

SPP System 用的冷休克表达载体与 pCold 冷休克表达载体一样, 根据 TEE 序列、His tag 和 Factor Xa 酶切位点序列有无, 分成 4 个载体, 分别是 pCold I-IV (SP-4) DNA (表 1 和图 2), pCold IV (SP-4) 在多克隆位点的上游没有附加的序列。

SPP System 作用原理:

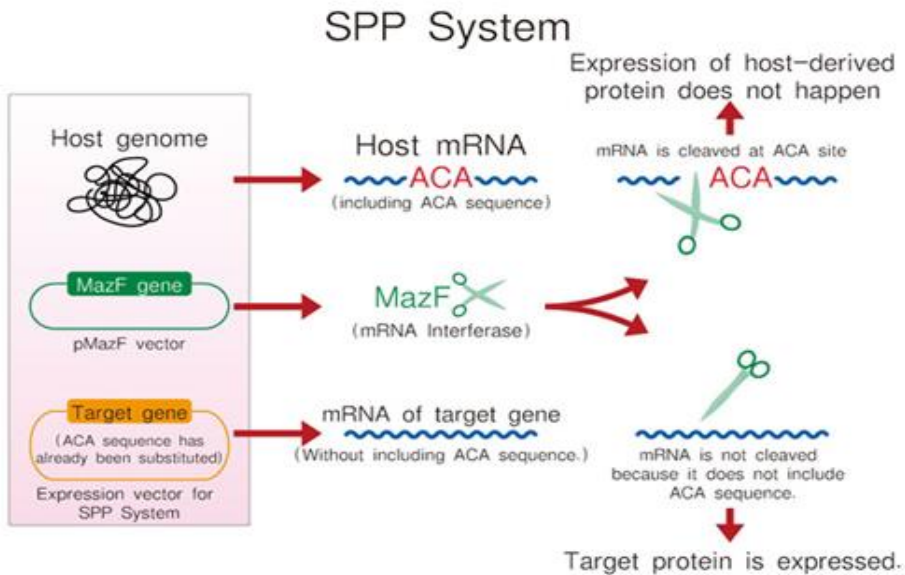


图 1. SPP System 的原理图

● 制品内容

SPP System Set (Code No. 3366)

1. Cold Shock Expression vector for SPP System 各 20 μg (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
pCold I (SP-4) DNA、pCold II (SP-4) DNA、
pCold III (SP-4) DNA、pCold IV (SP-4) DNA
2. MazF (mRNA Interferase) 表达质粒 pMazF DNA 0.5 μg (20 $\text{ng}/\mu\text{l}$)
3. Positive Control pCold I (SP-4) envZB DNA 0.2 μg (20 $\text{ng}/\mu\text{l}$)
pCold I (SP-4) DNA 插入了不含有 ACA 序列的大肠杆菌蛋白质 envZB 的 ORF 的表达质粒 (表达蛋白质分子量为 19.6 kDa)

SPP System I (Code No. 3367)

1. Cold Shock Expression vector for SPP System pCold I (SP-4) DNA 20 μg (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
2. MazF (mRNA Interferase) 表达质粒 pMazF DNA 0.5 μg (20 $\text{ng}/\mu\text{l}$)
3. Positive Control pCold I (SP-4) envZB DNA 0.2 μg (20 $\text{ng}/\mu\text{l}$)

SPP System II (Code No. 3368)

1. Cold Shock Expression vector for SPP System pCold II (SP-4) DNA 20 μg (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
2. MazF (mRNA Interferase) 表达质粒 pMazF DNA 0.5 μg (20 $\text{ng}/\mu\text{l}$)
3. Positive Control pCold I (SP-4) envZB DNA 0.2 μg (20 $\text{ng}/\mu\text{l}$)

SPP System III (Code No. 3369)

1. Cold Shock Expression vector for SPP System pCold III (SP-4) DNA 20 μg (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
2. MazF (mRNA Interferase) 表达质粒 pMazF DNA 0.5 μg (20 $\text{ng}/\mu\text{l}$)
3. Positive Control pCold I (SP-4) envZB DNA 0.2 μg (20 $\text{ng}/\mu\text{l}$)

SPP System IV (Code No. 3370)

1. Cold Shock Expression vector for SPP System pCold IV (SP-4) DNA 20 μg (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
2. MazF (mRNA Interferase) 表达质粒 pMazF DNA 0.5 μg (20 $\text{ng}/\mu\text{l}$)
3. Positive Control pCold I (SP-4) envZB DNA 0.2 μg (20 $\text{ng}/\mu\text{l}$)

<大肠杆菌表达体系>

SPP System 冷休克表达载体利用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使用。但是，由于共表达载体 pMazF DNA 的选择标记是氯霉素，所以具有氯霉素抗性的大肠杆菌不能作为宿主使用，例如 Rosetta™(Novagen)。

● 载体图谱

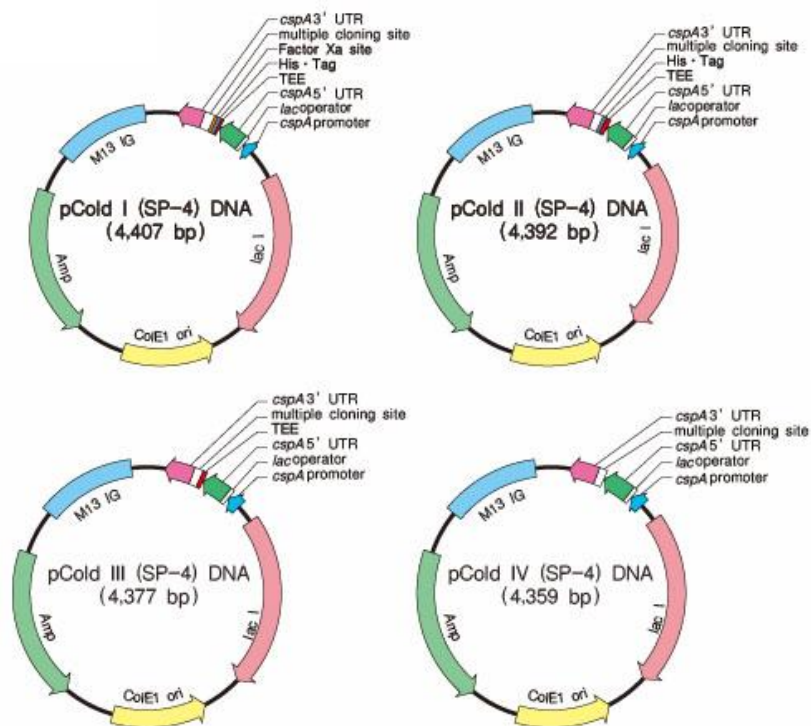


图2 pCold I – IV (SP-4) DNA 表达载体图谱

表 1 pCold (SP-4) DNA 的标签

载体	TEE序列	His tag序列	Factor Xa切断序列	GenBank 登录号
pCold I (SP-4) DNA	○	○	○	AB248600
pCold II (SP-4) DNA	○	○	-	AB248601
pCold III (SP-4) DNA	○	-	-	AB248602
pCold IV (SP-4) DNA	-	-	-	AB248603

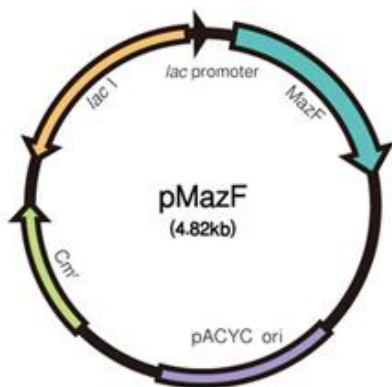


图3. MazF表达质粒pMazF DNA载体图谱

● 贮存溶液

10 mM Tris-HCl (pH8.0)
1 mM EDTA

● 纯度

用于 pCold (SP-4) DNA 系列载体

1. 双脱氧法测序确认多克隆位点的存在。
2. 确认多克隆位点上的限制酶 *Nde* I, *Sac* I, *Kpn* I, *Xho* I, *Bam*H I, *Eco*R I, *Hind* III, *Sal* I, *Pst* I 和 *Xba* I 只有一个酶切位点。

● 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

1. 非 ACA 序列的目的蛋白质表达载体构建

- 1) 在保持氨基酸序列不变的情况下, 设计并合成不含 ACA 序列目的基因, 以置换原来的目的基因。这个不含 ACA 序列的目的基因两端也可以设计限制酶酶切位点, 以便克隆到 pCold (SP-4) DNA 中。
- 2) 通过化学合成或定点突变的方法合成和克隆 1) 中设计的基因序列。
- 3) 将 2) 的基因克隆到 pCold I-IV(SP-4) DNA 中, 获得不含 ACA 序列的目的蛋白质表达载体。

2. SPP System 构建

将 1 中获得的 不含 ACA 序列的目的蛋白质表达载体和 pMazF DNA 同时转化到大肠杆菌表达宿主中。在含有氨苄青霉素 (100 $\mu\text{g/ml}$) 和氯霉素 (34 $\mu\text{g/ml}$) 平板上培养, 筛选共表达的转化子 (含有目的基因和 MazF 基因)。

使用各自约 50 ng 的质粒, 就可以获得足够的转化子。

使用时再将转化产物置于冰上, 因为 pCold (SP-4) 使用了冷休克蛋白 *cspA* 基因的启动子, 在低温条件下会启动目的基因表达。

注意, 本系统不能与含有氯霉素抗性基因的大肠杆菌宿主或者携带氯霉素抗性基因的质粒一同使用。 *E. coli* BL21 是一个适用本系统的宿主菌, 可以购买 TaKaRa Competent Cells BL21 (Code No. 9126)。

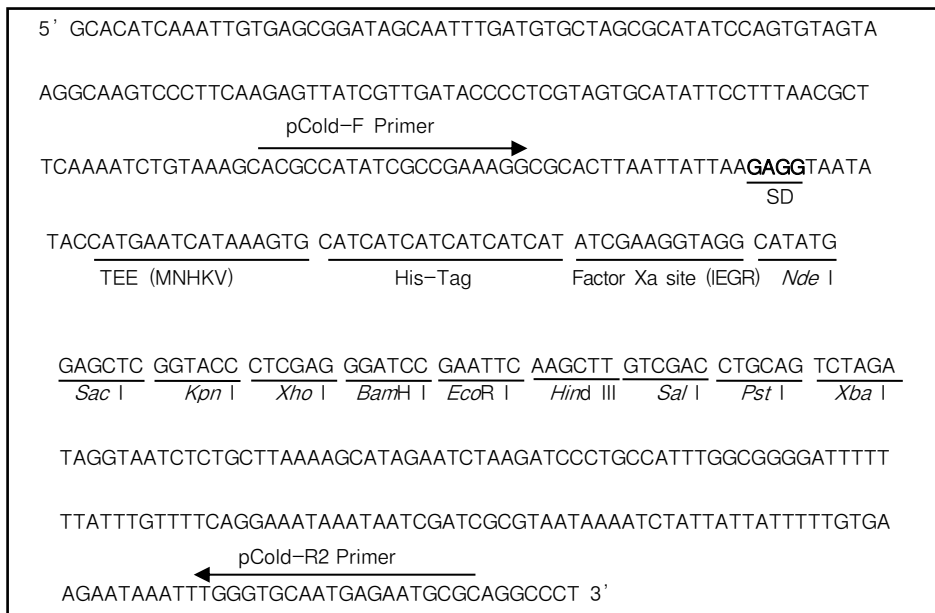
3. 目的蛋白质在 M9-glucose 培养基中进行脉冲标记 (Pulse-Labeling)

- 1) 将 2 得到的共表达的转化子接种到预温至 37°C 的 M9-glucose 培养液* (氨苄青霉素 (100 $\mu\text{g/ml}$) 和氯霉素 (34 $\mu\text{g/ml}$) 中, 37°C 培养并检测其 OD₆₀₀ 数值。
- 2) 培养液 OD₆₀₀ 达到 0.5 左右时, 迅速冷却至 15°C, 静置 45 分钟。
- 3) 添加 IPTG 使其终浓度为 1 mM, 15°C 振荡培养 24 小时。
- 4) 添加 [³⁵S]-甲硫氨酸到培养液中, 15°C 放置 15 分钟, 进行脉冲标记。
- 5) 培养液集菌, SDS-PAGE 电泳后, 进行放射自显影, 确认标记的蛋白质。

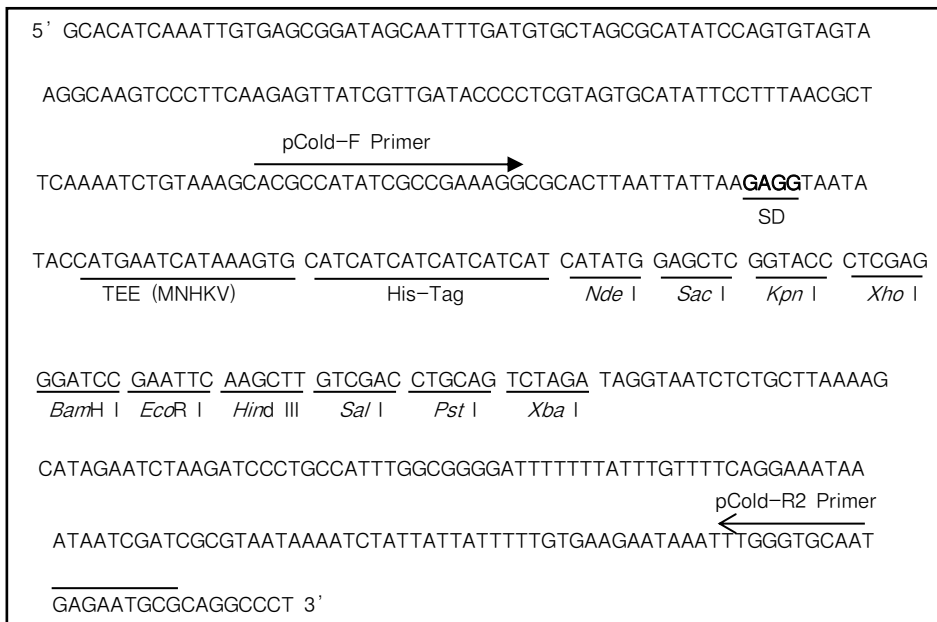
*LB 培养液中含有由 *lac* 操纵子控制的用于表达的微量诱导剂, 为了防止出现此现象, 建议使用最小培养基或 M9-glucose 培养基。

● pCold I-IV (SP4) DNA 的多克隆位点图谱

pCold I (SP-4) DNA



pCold II (SP-4) DNA



pCold III (SP-4) DNA



pCold IV (SP-4) DNA



● 实验例

使用 SPP 系统表达 *E. coli* envZB

1. 使用 M9-glucose 培养基进行蛋白质脉冲标记 (pulse-labeling)

以下实验例使用了 Positive Control pCold I (SP-4) envZB DNA, 与 MazF 共表达 (MazF+) 和非共表达 (MazF-), 以大肠杆菌 BL21 作为宿主。脉冲标记后, 宿主自身蛋白的标记结果会产生不同程度的本底影响, 但使用 SPP 系统结果显示显著的低本底影响。(图 4)

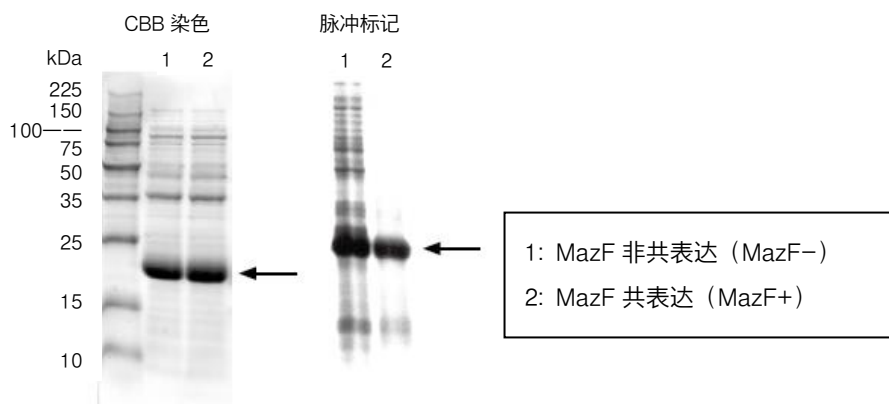


图 4. envZB 蛋白质的表达 (菌体可溶性的 CBB 染色和脉冲标记)

2. 在 LB 培养基中表达 *E. coli* envZB

以下实验例使用了 Positive Control pCold I (SP-4) envZB DNA, 与 MazF 共表达 (MazF+) 和非共表达 (MazF-), 以大肠杆菌 BL21 作为宿主。

按如下方法进行操作, 取 OD₆₀₀=0.1 的菌体进行电泳确认。结果显示与 MazF 共表达 (MazF+) 和非共表达 (MazF-) 的产物水平没有显著差异 (图 5)。在表达体系中, 目的蛋白质之外的宿主蛋白质的表达受到 MazF 抑制。同时大肠杆菌本身也存在生长压力, 所以与普通 pCold DNA 相比较, 有时目的蛋白质的表达量可能会降低。

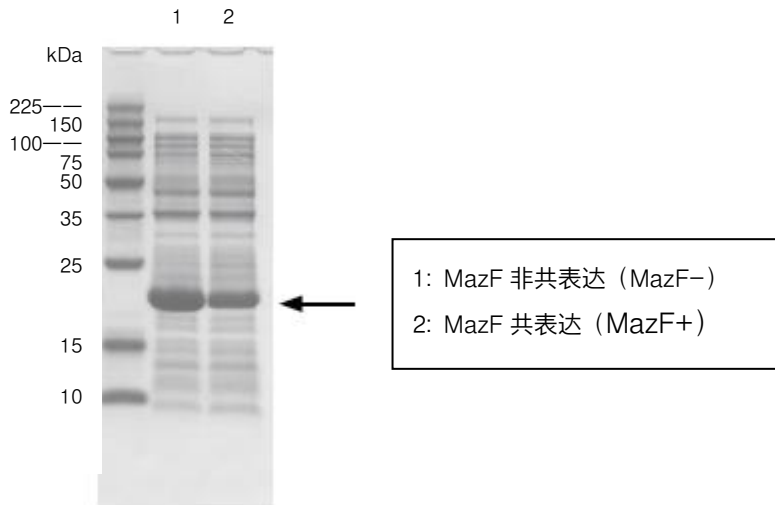


图 5. envZB 蛋白质的表达 (菌体可溶性的 CBB 染色)

● Q&A

Q1. 如果表达蛋白质不可溶, 如何研讨?

A1. 应对策略如下:

- 改变冷却时间以及 IPTG 的添加时间 (可能需要对培养对数期早期及末期进行一些检测)。
- 降低 IPTG 的添加浓度 (低至 0.1 mM)。
- 更改宿主菌 *E. coli* 的种类。
- 提取方法的变更。超声波处理时加入 0.1–1% 的表面活性剂 (例如: Octyl Glucoside、NP-40、Triton X-100 等)。

Q2. SPP 系统选择冷休克表达载体的标准是什么?

A2. 当使用 pCold I (SP-4), pCold II (SP-4) 和 pCold III (SP-4) 的时候, TEE 有利于目的基因的翻译。使用 pCold I (SP-4) 和 pCold II (SP-4) 表达的蛋白可以依靠 Ni 柱和 Co 柱的 His-Tag 亲和能力进行纯化。如果不希望目的蛋白质的 N 末端有多余的氨基酸, 则建议使用 pCold I (SP-4), 因为它含有 Factor Xa, 能够切掉标签序列; 也可以使用不含 TEE 或标签序列的 pCold IV (SP-4) 载体。

Q3. 1 L 培养基的蛋白质表达量有多少?

A3. 虽然目的蛋白质的种类不同, 通常都能有几 mg/L–几十 mg/L 的表达量。在 MazF 共表达系统中, 除了目的蛋白质, 其它蛋白质的合成均受到抑制, 如果进行 SDS-PAGE 电泳, 通过 CBB 染色能够检测到目的蛋白质, 则 3 L 的培养基能够回收得到 mg 级别的蛋白质纯化产物。这种共表达的除目的蛋白质外的抑制可能会造成大肠杆菌自身的生长压力, 所以与普通 pCold DNA 相比较, 目的蛋白质的表达量也可能会降低。

● 参考文献:

1. Suzuki M, Mao L, and Inouye M. Single protein production (SPP) system in *Escherichia coli*. *Nature Protocols*. (2007) **2**: 1802–1810.
2. Suzuki M, Roy R, Zheng H, Woychik N, and Inouye M. Bacterial Bioreactors for High Yield Production of Recombinant Protein. *J Biol Chem*. (2006) **281**: 37559–37565.
3. Suzuki M, *et al*. Single Protein Production in Living Cells Facilitated by an mRNA Interferase. *Molecular Cell*. (2005) **18**: 253–261.
4. Zhang Y, *et al*. Insights into the mRNA cleavage mechanism by MazF, an mRNA interferase. *Journal of Biological Chemistry*. (2004) **280**: 3143–3150.
5. Zhang Y, *et al*. MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Molecular Cell*. (2003) **12**: 913–923.
6. Qing G, *et al*. Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*. (2004) **22**: 877–882.

● 关联产品

mRNA Interferase™–MazF (Code No. 2415A)

pCold™ Vector Series (Code No. 3360 – 3364)

TaKaRa Competent Cells BL21 (Code No. 9126)

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

SPP System, pCold, and Interferase are trademarks of Takara Bio 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>

v201910Da