

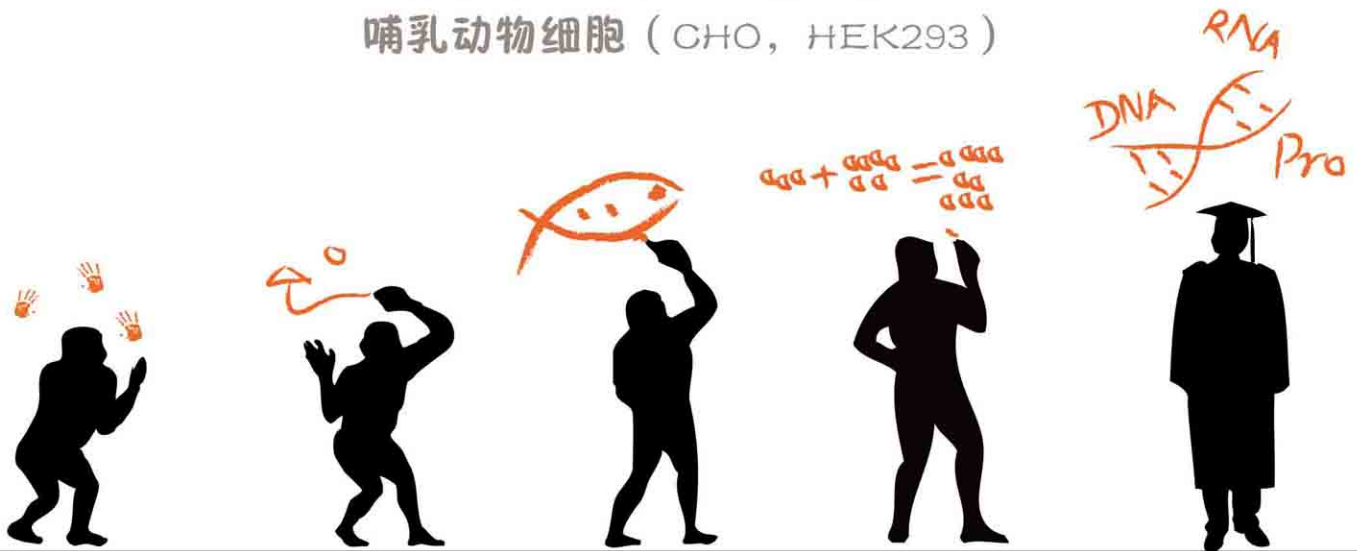
钟鼎生物
ZONBIO BIOTECHNOLOGY

蛋白表达服务系列

酵母细胞体系（毕赤酵母）

原核细胞体系（大肠杆菌）

哺乳动物细胞（CHO, HEK293）



公司名称：南京钟鼎生物技术有限公司
分子生物学技术服务 025-84448440-601
基因工程操作技术服务 025-84448440-608
免疫学检测技术服务 025-84448440-602
项目合作 025-84448440-601
传真：025-84448440-609

邮箱：order@zoonbio.com 公司网址：www.zoonbio.com

联系地址：江苏省南京市玄武区孝陵卫双拜巷78号紫金山创业科技园A座2楼（邮编 210014）

免费热线：400-025-1124

抗体制备技术服务 025-84448440-611

蛋白表达技术服务 025-84448440-608

蛋白质解析服务 025-84448440-608

行政外联 025-84448440-606

钟鼎酵母蛋白表达

“超人”一等

表达有困难，请找“超人”！



超人热线

400-025-1124



毕赤酵母蛋白表达服务概述

酵母表达系统是工业微生物中应用较广泛的系统，兼有了原核表达的周期短、成本低廉、易操作等优点，易于工业级别放大培养；同时具备了真核细胞对蛋白的空间折叠，糖基化修饰等能力，使得蛋白可溶性大幅度提高，为研究蛋白的生理活性提供了强有力的工具。

酵母蛋白表达实验过程中，影响实验结果因素很多，诱导时间、诱导温度、目的基因拷贝数、培养条件以及鉴定方法等，都会导致实验结果的区别。任何小小的疏忽，几个月的辛苦将付诸东流，钟鼎生物技术人员具有丰富的经验，能够最大限度发掘菌株的表达潜能，提高表达成功率和表达水平。

欲善其事，先利其器，有请“博学多才”的钟小博介绍钟鼎的特色表达载体pYE-GAP α



姓名：钟小博

性别：男

年龄：27岁

学历：博士

头衔：科学家

擅长领域：蛋白、分子

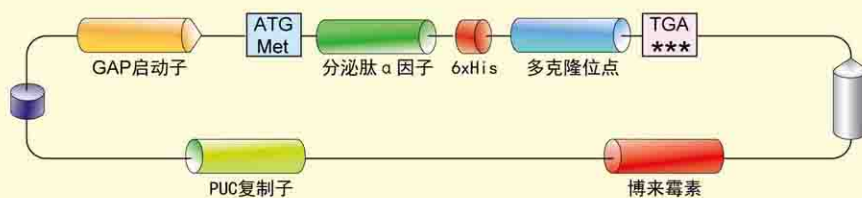
女盆友：钟小美

标签：人见人爱

帅气多才，近视眼

吃货，小分夫

- 使用GAP（3-磷酸甘油醛脱氢酶）为启动子，培养基中只要有葡萄糖，启动子即可工作，分泌蛋白，无需添加甲醇诱导，摆脱常规甲醇诱导实验中繁琐操作及安全隐惠
- 自带信号分泌杯，表达的蛋白经过自我剪切，源源不断的输送蛋白至细胞膜外
- 多克隆区域之前，载体自带His标签蛋白，与目的蛋白融合表达，给纯化和检测带来便利
- Zeocin（博来霉素）抗性，既可以作为筛选抗性，也可以作为高拷贝筛选的标记物，自带PUC复制子，质粒可以在大肠杆菌中以高拷贝形式增殖，进一步减少实验难度。



pYE-GAP α 载体示意图 (3080bp)



酵母蛋白表达服务-毕赤酵母表达体系

生命科学进入后基因组时代, 在许多科研项目中, 获得具有空间结构和生物学活性的重组蛋白是非常关键的步骤。虽然原核体系也能获得蛋白, 但是由于宿主系统的限制, 依然有很大一部分重组蛋白没有活性。

毕赤酵母体系是真核体系中操作简单、成本低廉的系统, 在蛋白加工、折叠、翻译后修饰等方面具有诸多优势, 在毕赤酵母体系中蛋白转录后糖基化所增加的寡糖链长度(平均每个支链8-14个甘露糖残基)非常接近高等真核生物的结构, 活性几率大大高于原核体系。

钟鼎生物具有丰富的宿主细胞资源和载体选择经验, 同时改造并开发了GAP启动子的创新pYE-GAP α 载体。进一步改善了蛋白诱导表达的操作步骤, 无需在诱导过程中更换培养基, 也无需在表达过程中检测甲醇含量, 有效的提高细胞密度及蛋白产量。

毕赤酵母体系蛋白表达实验步骤及交付标准

1、表达体系系统选择(客户提供表达菌株的略过此步骤, 仅提供表达质粒的可选择需要电转化的表达菌株)

1.1、可选表达载体

- » GAP启动子载体: pYE-GAP α ;
- » 常规商业化载体: 分泌表达: pPICZ α A、pPIC9K,
胞内表达: pPICZA、pPIC3.5K

1.2、可选表达菌株

- » GS115, X33菌株
- » SMD116蛋白酶缺失型菌株

2、表达载体构建

实验周期	交付数据及实验材料	报价详情
A: 基因优化	1、基因合成报告	基因合成
亚克隆设计	2、测序验证报告	2.0元/碱基
合成基因	3、包含表达质粒的大肠杆菌DH5 α	亚克隆 0~1200元 (依据基因长度)
B: 亚克隆至载体	4、表达质粒	中抽+线性化 1000元
C: 质粒中抽及线性化-10 μ g	5、线性化检测图片	

3、蛋白表达鉴定

实验周期	交付数据及实验材料	报价详情
D、电击转化	6、阳性表达菌株	获得阳性菌株(5-10株)
E、阳性克隆子筛选(PCR法)	7、PCR鉴定阳性菌株图	3500元
F、高拷贝菌株筛选(可选)	8、高拷贝阳性菌株(可选)	高拷贝菌株(1-5株)
G、表达小试(5-10菌株)	9、小试表达流程报告	3000元(可选)
H、表达分析鉴定(Dot杂交)	10、Dot Blot实验结果	小试表达鉴定
I、定株, 优化表达条件	11、小试表达总结	5000元

4、蛋白纯化及鉴定

实验周期	交付数据及实验材料	报价详情
J、放大培养2-5升	12、蛋白纯化流程报告	蛋白纯化(2-5升)
K、表达上清液浓缩	13、蛋白纯化原始图片	4500元
L、Ni柱低压亲和纯化	14、发货蛋白	Western Blot(免费)
M、PAGE分析纯化过程	15、Western Blot(标签抗体)	肽指纹图谱
N、WB鉴定纯化后蛋白	16、蛋白指纹图谱(可选)	800元(可选)
O、PFM检测(可选)	17、蛋白质谱分子量(可选)	蛋白质分子量质谱
P、MS检测(可选)		600元(可选)

补充说明

酵母细胞对密码子偏爱性要求较高, 建议进行基因优化后再进行表达以提高成功率

- 1、正常情况下采用分步收费原则来收取费用, 特殊订单承诺不成功不收费(详情请咨询公司技术客服 400-025-1124)
- 2、不同的蛋白表达量差异很大, 我们会尽量提供mg级别以上的蛋白量给客户。
- 3、即使订单失败, 我们也会提供全套的实验流程和原始照片, 并将表达菌株及表达质粒返还给客户。



3、酵母感受态细胞制备:

- 1、取100ul菌液, 接入到装有10 mL YPD液体培养基试管中, 30°C, 280 rpm过夜培养。
 - 2、将3mL过夜培养液接入到50mLYPD液体培养基的三角瓶中, 30°C, 280 rpm培养至OD值1.3-1.5之间, 待用。
 - 3、在无菌操作台内将上述菌液倒入到灭过菌的离心管中, 5000rpm、4° C离心5min, 弃上清, 用50 mL冰浴无菌水重悬菌体。
 - 4、5000rpm、4° C离心5min, 弃上清, 用25 mL冰浴无菌水重悬菌体。
 - 5、5000rpm、4° C离心5min, 弃上清, 用10 mL冰浴的1M山梨醇溶液重悬菌体。
 - 6、5000rpm、4° C离心5min, 弃上清, 用400uL冰浴的1M山梨醇溶液重悬菌体。
- 最终得到500ul毕赤酵母感受态细胞, 分装成80ul/管备用, 感受态细胞一般现做现用以确保电转效率更高。

4、电转酵母细胞

- 1、冰浴电转杯, 将10uL线性化质粒pGAPZaA-0620加入到装有80uL毕赤酵母感受态酵母细胞的1.5mLEP管内, 混匀后加入到直径为0.2 cm电转化杯中, 将310uL等渗溶液加入到电转化杯中, 然后把电转杯冰浴5min。
- 2、电击条件为: 电压1700V、时间8mS、电击2次。
- 3、电击完成后, 将1mL冰上预冷的浓度为1M山梨醇溶液加入到电击转化杯里, 用枪头轻轻地吹打溶液均匀。把电转杯中的全部液体转移到新的2ml EP管中, 30度静置培养2h。分别吸取50uL、100uL和200uL线性化质粒pGAPZaA-0620的混合液涂布于100ug/ml Zeocin抗生素YPD平板上, 30度恒温培养48小时, 待平板长出菌落, 用接种环挑取平板上生长的单菌, 将它接入到装有10ml YPD液体培养基试管中(抗生素Zeocin浓度100ug/ml), 30度, 180rpm过夜培养。(高拷贝筛选需额外进行单独的实验操作, 此处省略)

图1: 常规阳性克隆平板



图2: 高拷贝阳性克隆平板



5、PCR鉴定阳性克隆菌株

挑选10株阳性克隆, 分别提取基因组DNA, 使用5' pGAP priming和 3' AOX1 priming引物PCR鉴定结果如下图所示, 结果显示均为阳性, 按照预期, 目标条带应该在1.5K左右。

图3: 阳性克隆酵母基因组提取

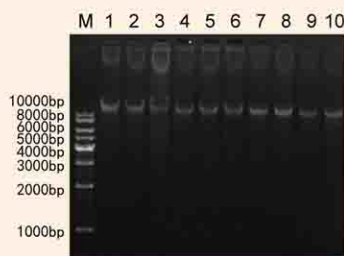
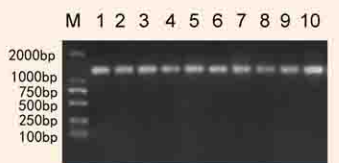


图4: 基因组PCR检测



说明: 以阳性菌株的基因组为模板, 引物扩增产物检测如图所示, 结果显示目的基因均整合至基因组。

图5: 阳性克隆表达产物Dot-Blot检测

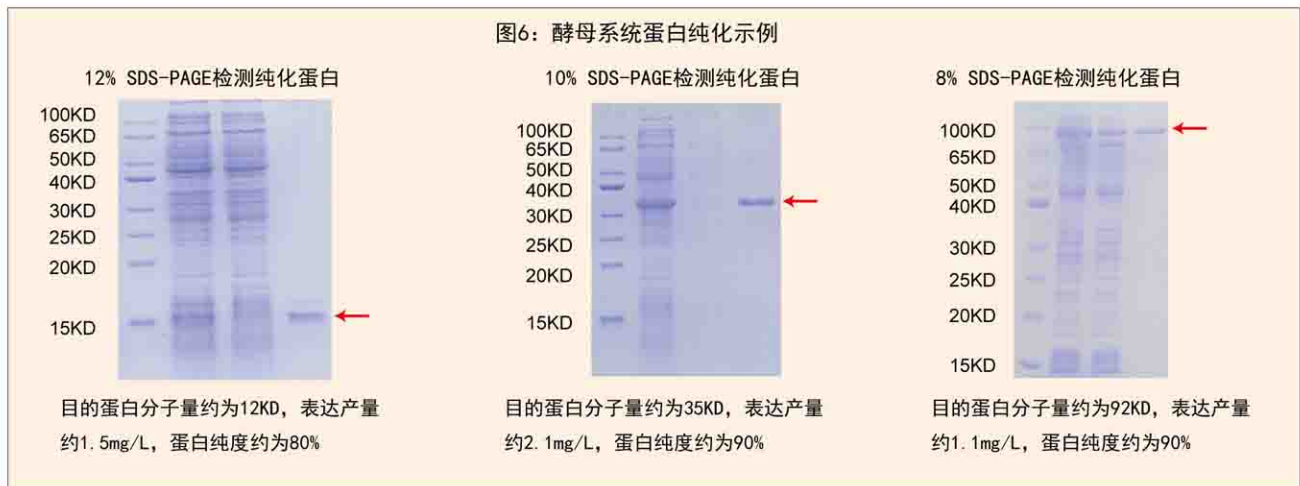


6、小试表达

- 1、取上述鉴定阳性的表达菌株（1-10号菌株）分别接入装有9ml YPD（抗生素Zeocin 200ug/mL）的试管中，30度、220rpm培养24h
- 2、取24h培养菌种500uL接入到50ml YPD（抗生素Zeocin 200ug/mL）液体培养基中，30度、220rpm培养，48h后从培养基中取样，10000rpm、2min离心收集上清液，
- 3、分别对10份菌株的表达上清使用Dot-Bot（anti-his抗体）检测，查看实验结果。（Dot-Blot实验结果案例见上页图5）
- 4、经过Dot-Blot实验分析，大部分克隆表达呈阳性，其中1号菌株阳性信号最强，使用1号菌株放大培养。

7、放大培养及纯化

- 1、挑选表达最明显的1号菌株放大至1L体系（YPD培养基 Zeocin 200ug/ml），30度、220rpm培养，72小时收集上清培养液。
- 2、72小时发酵液浓缩后以0.5 ml/min流速上样至利用低压层析系统，通过Ni-IDA Binding-Buffer预平衡的Ni-IDA -Sephrose CL-6B亲和层析柱，。
- 3、用Ni-IDA Binding-Buffer以0.5 ml/min流速冲洗，至流出液OD280值到达基线；
- 4、用Ni-IDA Washing Buffer（20 mM Tris-HCl，20 mM咪唑，0.15 M NaCl，pH8.0）以1 ml/min流速冲洗，至流出液OD280值到达基线
- 5、用Ni-IDA Elution-Buffer（20 mM Tris-HCl，250 mM咪唑，0.15 M NaCl，pH8.0）以1 ml/min流速洗脱目的蛋白，收集流出液
- 6、将上述收集的蛋白溶液加入透析袋中，使用PBS（PH7.4）进行透析过夜后进行SDS-PAGE分析。



8、蛋白质鉴定

对纯化后的蛋白，依据合同约定，进一步验证蛋白质的正确性，可选的方法有western blot，MS（分子量质谱），PFM（肽指纹图谱）具体的实验案例请参照对应的服务项目，此处省略。

补充说明：

依据我们的大量实践经验表明：利用酵母体系进行蛋白表达，蛋白表达成功率相对原核表达体系及偏低。在实验室的摇瓶状态下，受培养条件，特别是溶氧量的限制，很难实现高细胞密度培养，因此单位体积的产量偏低，很多时候甚至无法纯化或纯化成本极高，因此我们无法具体的承诺交付的蛋白量，最终会依据培养的体积来纯化并交付蛋白。另外，酵母分泌的蛋白经过高尔基体的细胞器的修饰，会有糖基化、二硫键、三级结构等，其表观分子量往往会稍微偏大于理论分子量。