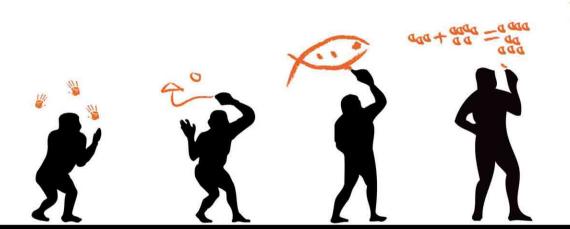


蛋白表达服务系列

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

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

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)

钟鼎鹏 母蛋白表达

"超人"一等

表达有困难,请找"超人"!







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。

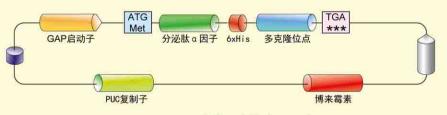
欲善其事,先利其器,有请"博学多才"的钟小博介绍钟鼎的特色表达载体pYE-GAPα



姓名: 钟小博 性别: 男 年龄: 4岁 学历: 博士 失術: 砖象 檀长领域: 蛋白、分子 女盆灰: 种小美 称签: 人见人爱 帅气多才, 近视眼

吃货, 小分头

- ◆ 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碎作及安全隐患
- 🌡 自带信号分泌肽,表达的蛋白经过自致剪切、源源不断的输送蛋白型细胞膜外
- ₩ 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, 自帶
 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-GAPα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,同时改造并开发了的GAP启动子的创新pYE-GAPα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-GAPα,;
- ≫常规商业化载体:分泌表达:pPICZ a 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 亚克隆设计 合成基因 B:亚克隆至载体 C:质粒中抽及线性化-10ug	基因合成 2周左右 亚克隆 1-2周 线性化 2-3天	1、基因合成报告 2、测序验证报告 3、包含表达质粒的大肠杆菌DH5a 4、表达质粒 5、线性化检测图片	基因合成 2.0元/碱基 亚克隆 0~1200元 (依据基因长度) 中抽+线性化 1000元
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 E、阳性克隆子筛选(PCR法) F、高拷贝菌株筛选(可选) G、表达小试(5-10菌株) H、表达分析鉴定(Dot杂交) I、定株,优化表达条件	电转化及鉴定 1-2周 高拷贝筛选 2-3周(可选) 表达小试及鉴定 1-2周	6、阳性表达菌株 7、PCR鉴定阳性菌株图 8、高拷贝阳性菌株(可选) 9、小试表达流程报告 10、Dot Blot实验结果 11、小试表达总结	获得阳性菌株(5-10株) 3500元 高拷贝菌株(1-5株) 3000元(可选) 小试表达鉴定 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 K、表达上清液浓缩 L、Ni柱低压亲和纯化 M、PAGE分析纯化过程 N、WB鉴定纯化后蛋白 O、PFM检测(可选) P、MS检测(可选)	放大培养 2-3周 蛋白纯化 1-2周 WB 1周 PMF 2-3周 MS 1-2周	12、蛋白纯化流程报告 13、蛋白纯化原始图片 14、发货蛋白 15、Western Blot(标签抗体) 16、蛋白指纹图谱(可选) 17、蛋白质谱分子量(可选)	蛋白纯化(2-5升) 4500元 Western Blot (免费) 肽指纹图谱 800元 (可选) 蛋白分子量质谱 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。

毕赤酵母蛋白表达服务实验报告案例

一、实验设计

依据客户提供的蛋白序列,优化密码子使之更适宜在毕赤酵母中表达,采用全基因合成的方法合成基因XXX,经目的基因业元隆至pYE-GAP a 载体的多克隆位点区域,N端携带6XHis标签蛋白,获得的质粒经酶切及测序验证无误后,中抽质粒利用AVr II线性化重组质粒pYE-GAP a -XXX,电转化毕赤酵母SMD1168菌株,挑选5-10株阳性克隆,并通过PCR验证,选择3-5株阳性菌株进行表达,通过Dot-BIot验证其表达情况,定株后选用1株放大培养。按照实验预期:细胞培养过程中,XXX-His蛋白将会分泌表达至培养基中,通过SDS-PAGE电泳检测及WB验证目的蛋白的表达情况,通过Ni柱的亲和纯化,获得XXX-His蛋白。

二、试剂和耗材

pYE-GAPα-XXX质粒(钟鼎实验保存),DH5α 菌株(钟鼎生物保种),SMD1168或X33(购自Life公司,钟鼎实验保存),Protein Marker(钟鼎生物自制),PVDF膜(购自美国Millipore公司),X光片(购自美国柯达公司),ECL显色液(购自中国普利莱公司),鼠抗His单抗(钟鼎生物实验室自制),免抗鼠HRP二抗(钟鼎生物实验室自制),Acr、Bis、Tris等(购自Sigma公司),SDS(购自Amresco公司),Tyrptone、Yeast Extract(购自 0X0ID公司),PCR反应管(购自Fisher公司),0.22 μm无菌滤器和透析袋(购自Millipore公司),Ni2+IDA亲和层析胶(zoonbio公司)Agarose(购自上海基因公司),DNA胶纯化试剂盒、质粒小提试剂盒(购自AXYGEN公司),SAC I(购自宝生物),常规生化试剂为国产分析纯。

培养基配方如下:

LB培养基: 胰蛋白陈1%、酵母提取物0.5%、氯化钠1%, 琼脂粉1.5%(固体用)、NaOH调PH至7.4。

Low-Sat I LB培养基: 胰蛋白胨1%、酵母提取物0.5%、氯化钠0.5%、琼脂粉1.5%(固体用)、NaOH调pH至7.4。

YPD培养基: 胰蛋白胨2%、酵母提取物1%、葡萄糖2%(过滤除菌)、琼脂粉1.5%(固体用)。

YPDS培养基: 胰蛋白胨2%、酵母提取物1%、葡萄糖2%(过滤除菌)、0.1mol/L山梨醇、琼脂粉1.5%(固体用)。

三、主要实验仪器

Allegra 21R 台式高速冷冻离心机 (美国BECKMAN公司), 台式高速离心机 (德国SORVAL公司), Biologic LP层析系统、Mini Protean II垂直平板电泳系统、Gel Doc2000成像系统、水平电泳系统(美国BIO-RAD公司), PTC-200基因扩增仪(美国MJ Research公司) 320-S pH计(美国Mettler Toledo公

嫁汉嫁汉就司), AR5120电子天平(美国AHOM S公司), MultiTemp III 恒温水浴锅、Hofer MV-25紫外透射仪(美国Amersham Pharmacia公司), 雪花状制冰机(日本SANYO公司), JY92-2D超声波细胞粉碎机(中国新芝科器研究所), 蛋白核酸检测仪(南京大学普阳科学仪器厂), Gene Pulser Xcell 电穿孔系统(美国BIO-RAD), 超净工作台(中国苏净集团), NANODROP2000(美国Thermo公司)

实验方法及结果

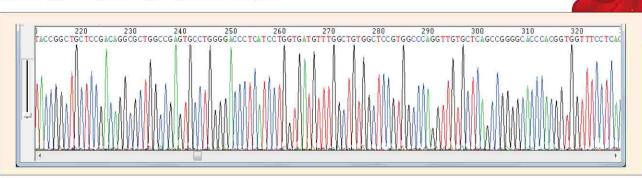
1、pYE-GAPα-XXX质粒构建

采用基于PAS (PCR-based Accurate Synthesis)的方法合成基因,双酶切连接pYE-GAP α -XXX的EcoR I和Not I; 挑取阳性克隆子测序,测序结果如下所示,单划线区域为该基因区域,其中红色字体为6xHis标签,蓝色字体为EK酶切位点。

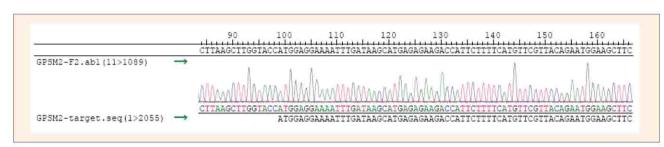
ATTCCTTGTTAAT TO TO THE TOTAL OF THE TOTAL O

GAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATCATTGAGTTTGTAGCCTTAGACATGACTGTTCCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTACG AGAAGACCCGGTCCTGCAGTTAATT

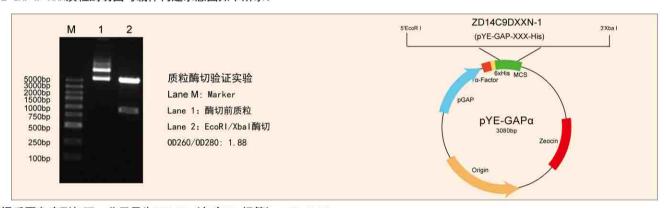
使用Chromas软件查看测序峰图文件,截取部分序列示例如下



测序拼接序列与理论序列相比对,结果显示获得序列与理论序列100%匹配,比对文件截图如下所示



pYE-GAP α-XXX质粒酶切图与载体构建示意图如下所示:



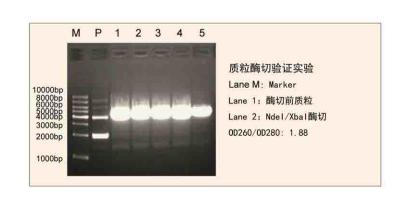
翻译后蛋白序列如下,分子量为XXX KD(包含His标签),PI 5.03:

2、pYE-GAPα-XXX质粒线性化

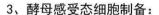
抽提质粒10ug左右,使用AVr II线性化, 冻干浓缩待用。

成份	体积	
AvrII	10 ul	
Buffer	20 ul	
质粒DNA	10 ug	
水	up to 100u	

酶切温度为 37℃, 水浴 3h, 1%琼脂糖凝胶电泳检测







- 1、取100ul菌液,接入到装有10 mL YPD液体培养基试管中,30℃,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0D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°0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500山毕赤酵母感受态细胞,分装成80U/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。

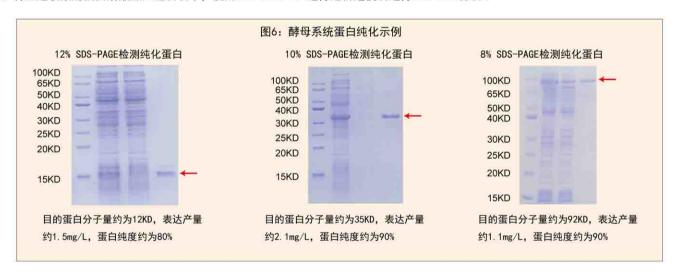


6、小试表达

- 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、220rp<mark>mt音素24h</mark>
- 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,48后h从培养基中取存,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 -Sepharose 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0D280值到达基线;
- 4、用Ni-IDA Washing Buffer (20 mM Tris-HCI, 20 mM咪唑, 0.15 M NaCI, pH8.0)以1 ml/min流速冲洗, 至流出液0D280值到达基线
- 5、用Ni-IDA Elution-Buffer (20 mM Tris-HCI, 250 mM咪唑, 0.15 M NaCI, 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。