

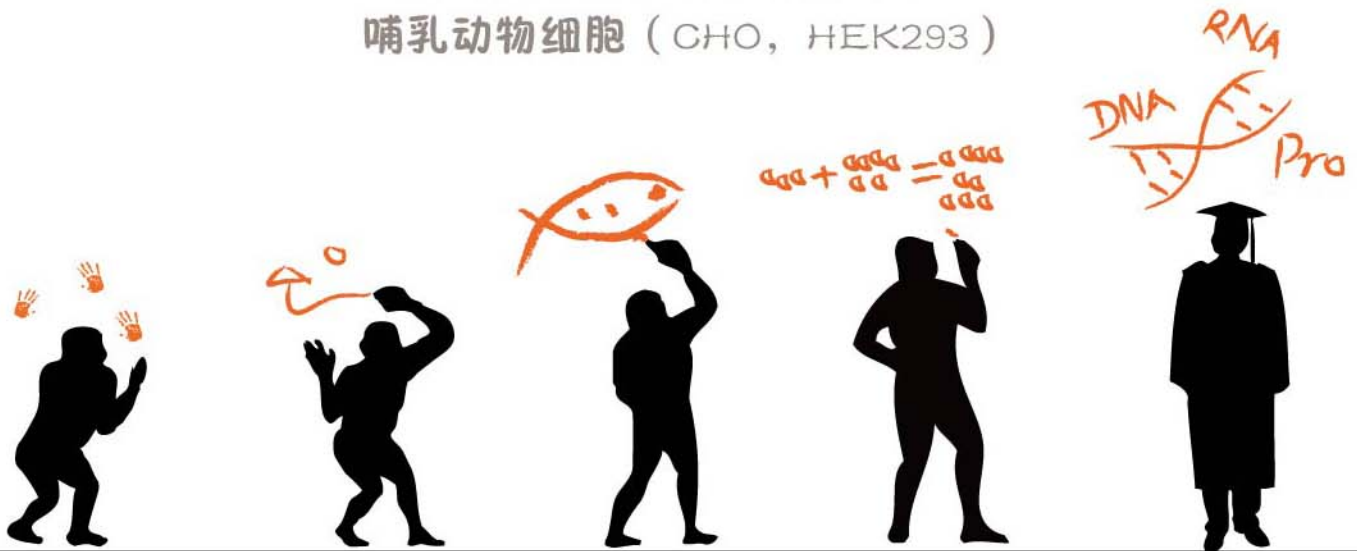
钟鼎生物  
ZONBIO BIOTECHNOLOGY

# 蛋白表达服务系列

## 原核体系（大肠杆菌）

酵母细胞体系（毕赤酵母）

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）



# 钟鼎原核蛋白表达

## “真功夫”

### 保证成功

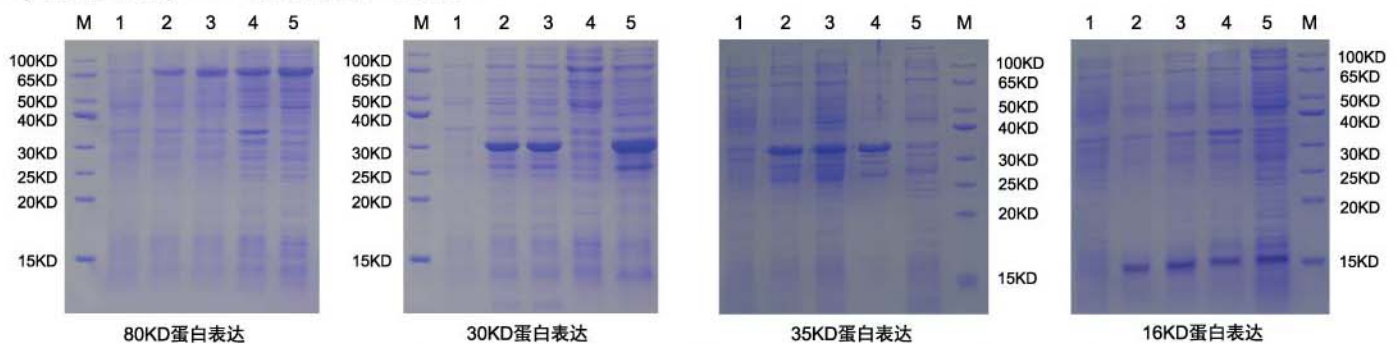
功夫热线: 400-025-1124



您是否在原核蛋白表达过程中遇到不表达或蛋白表达水平低、重组蛋白形成包涵体，无法在细胞上清中形成可溶蛋白等问题？

钟鼎生物构建了带有His标签和Sumo标签的特色质粒，同时筛了低温诱导体系的Arctic Express™ 高效表达菌株，11度超低温诱导表达，大幅度提高了重组蛋白上清可溶表达的几率，增加了表达成功率和原核蛋白产物的活性几率，“真功夫”保证，不成功分文不取！

钟鼎生物每年帮助客户完成200多种蛋白表达服务，平均每个工作日交付1个蛋白，成功率高达95%以上。其中上清表达占70%以上，据客户反馈，80%上清蛋白具有生物活性。



Lane M: Protein Marker Lane 1: 未诱导对照 Lane 2: 诱导后全菌 (克隆子1) Lane 3: 诱导后全菌 (克隆子2) Lane 4: 表达上清 Lane 5: 表达沉淀

### 2012-2013蛋白表达服务发表文献 (部分)

- 1、Expression and purification of soluble human APRIL in Ecoli using ELP-SUMO tag.
- 2、Production of bioactive human beta-defensin-4 in Ecoli using SUMO fusion partner.
- 3、Characterizing heat shock protein 90 gene of Apolygus lucorum (Meyer-Dür) and its expression in response to different temperature and pesticide stresses.
- 4、Cloning and prokaryotic expression of GmNAC8 gene isolated from soybean
- 5、10-HDA对意蜂幼虫发育影响及中蜂Royalactin mRNA水平和原核表达分析
- 6、Resilin-R5融合蛋白表达纯化及其材料性能研究
- 7、草鱼呼肠孤病毒HZ08株S10编码蛋白多克隆抗体制备及其特性分析
- 8、异常凝血酶DCP基因克隆表达、纯化及单克隆抗体制备与鉴定
- 9、家蚕核型多角体病毒egt基因的原核表达及侵染BmE细胞中的EGT蛋白检测
- 9、家蚕卵黄原蛋白受体 (BmVgR) 与配体结合及解离机制的初探
- 10、间日疟原虫醛缩酶的克隆、表达与初步鉴定
- 11、罗非鱼无乳链球菌C5a肽酶 (ScpB) 的原核表达及其免疫原性
- 12、取食不同寄主植物对绿盲蝽热激蛋白AIHSP90表达的影响
- 13、小鼠肝炎病毒N蛋白单克隆抗体的制备及鉴定
- 14、新型Resilin-R5融合蛋白的大肠杆菌表达和纯化
- 15、罗非鱼无乳链球菌LrrG蛋白的原核表达及免疫原性分析
- 16、猪带绦虫TS045W-4B基因的克隆、表达和抗体制备
- 17、猪带绦虫TSOL18基因的表达、纯化和免抗血清的制备
- 18、罗非鱼无乳链球菌C5a肽酶的原核表达及其免疫原性研究



## 原核蛋白表达服务-大肠杆菌表达体系

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。通过大肠杆菌E. coli体系获得重组蛋白,具有成本低、操作简便等优点,能够大幅的降低实验成本。但是大量的基因在原核系统中会由于不同种类的问题而导致无法在上清中获得目的蛋白,例如稀有密码子含量太高而导致不表达或蛋白表达水平低、重组蛋白形成包涵体,无法在细胞上清中形成可溶蛋白等。

钟鼎生物构建了带有His标签和Sumo标签的特色质粒,使用CspA冷休克蛋白启动子,11度低温诱导,同时筛选了低温诱导体系的Arctic Express高效表达菌株,构建了最具特色的超低温表达体系,大大提高了蛋白可溶表达的机率,增加了表达成功率和原核蛋白产物的活性概率。

目前,数以百计的用户使用我们的表达体系成功克服了蛋白表达实验难题,2013-2014年在中英文期刊发表论文二十余篇,随着时间的推移,“经典”正在成型。快来试试钟鼎的创新体系吧,您也是经典的铸造者之一,我们一起在路上!

### 原核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转化的表达菌株)

##### 1.1、可选表达载体

- » 低温诱导启动子载体: pCzn1-His, pCzn1-GST, pSumo-Mut;
- » 常规商业化载体: pET26, pET28, pET32等系列; pGEX-4T, pGEX-6T等系列; pMAL等系列

##### 1.2、可选表达菌株

- » Arctic Express低温诱导菌株系列
- » Origami高表达菌株系列
- Rosetta-GAMI稀有密码子兼容性菌株系列

#### 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

基因合成

2周

亚克隆

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

基因合成

2.0元/碱基

亚克隆

##### B: 亚克隆至载体

1周

4、表达质粒

5、质粒说明书

0~1200元

(依据基因长度)

#### 3、表达载体构建

##### 实验周期

##### 交付数据及实验材料

##### 报价详情

##### C: 转化

##### D: 表达小试

##### E: 表达分析鉴定

##### F: 扩大培养

转化表达

2天

表达小试

1周

6、阳性表达菌株

7、小试表达流程报告

8、小试表达分析原始图片

9、小试表达总结

小试表达鉴定

3000元

不成功不收费

#### 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

##### G: 蛋白亲和纯化(上清)

##### H: 包涵体蛋白变复性

##### I: WB鉴定纯化后蛋白

##### J: PFM检测(可选)

##### K: MS检测(可选)

蛋白纯化 1-2周

WB 1周

10、蛋白纯化流程报告

11、蛋白纯化原始图片

12、发货蛋白

13、Western Blot(标签抗体)

14、蛋白指纹图谱(可选)

15、蛋白质谱分子量(可选)

蛋白纯化 3000元

Western Blot(免费)

肽指纹图谱 800元

蛋白分子量质谱 600元



### 收费原则

我们会评估客户蛋白序列或基因序列,如果钟鼎技术人员可确认接受订单,我们承诺:

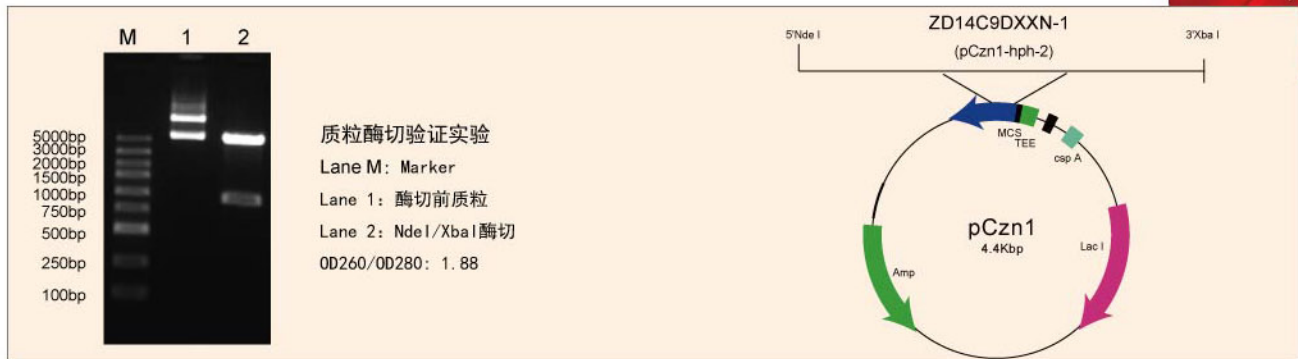
- 1、最终是否能得到高纯度的目的蛋白作为判断实验成功与否的唯一标准,
- 2、如最终无法交付蛋白,不收取任何蛋白表达部分实验费用,所有的实验成本由钟鼎生物承担,
- 3、即使订单失败,我们也会提供全套的实验流程和原始照片,并将表达菌株及表达质粒返还给客户。

**9折优惠**





pCzn1-HPH-2质粒图谱与酶切实验图分别如下:



## 2、pCzn1-HPH-2载体转化至大肠杆菌ArcticExpress™ (DE3)

1. 将质粒0.1 μg(约5ul)加入100 μl ArcticExpress™ (DE3) 感受态细菌中, 置冰上20min;
2. 42°C热激90 sec, 迅速置冰中5 min; 加入600 μl 37°C预热的LB培养液;
3. 37°C, 220 rpm振摇1 h, 离心后全部涂布于含50 μg/ml Amp的LB平板, 37°C倒置培养过夜。

## 3、IPTG诱导pCzn1-HPH-2载体融合蛋白的表达

1. 挑取转化平板上的单克隆接种于含50 μg/ml Amp的3 ml LB培养液的试管中, 37°C 220 rpm振摇过夜;
2. 次日按1: 100接种于50 μg/ml Amp的30 ml LB培养液中, 37°C 220 rpm振摇至菌体OD600为0.6 (约2h);
3. 取出1 ml培养物, 10000g室温离心2 min, 弃上清, 用100 μl 1×上样缓冲液重悬菌体沉淀;
4. 向剩余的培养物中加入IPTG至终浓度为0.5 mM, 37°C 220 rpm振摇4 h, 诱导HPH-2融合蛋白表达;
5. 取出1 ml培养物, 12000g室温离心2 min, 弃上清, 用100 μl 1×上样缓冲液重悬菌体沉淀。
6. 进行10% SDS-PAGE分析, 结果如图1所示。

## 4、HPH-2-His融合蛋白的纯化

1. 将诱导表达的培养菌体沉淀用20 ml Ni-IDA Binding-Buffer重悬后, 超声破碎(功率400 W, 工作4 sec, 间歇8 sec, 共20 min), 4°C 10000g离心20 min, 取上清;
2. 利用低压层析系统, 上清液以0.5 ml/min流速上样至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;
7. 进行10% SDS-PAGE分析, 结果如图2所示。

图1: 蛋白表达鉴定分析

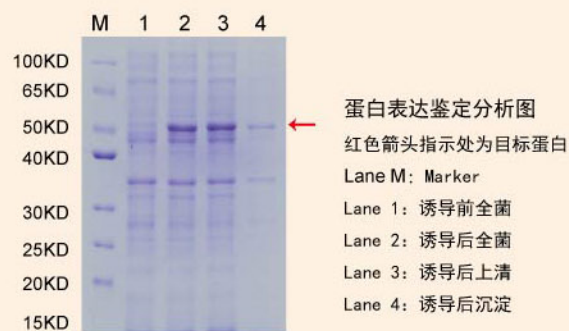
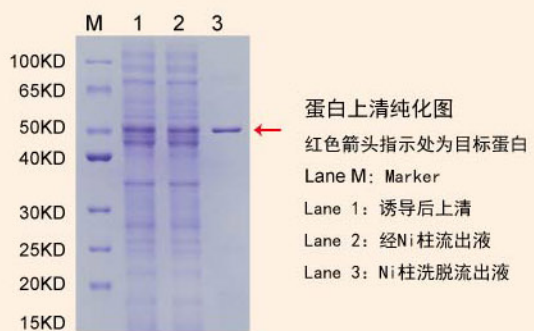


图2: 蛋白上清亲和纯化





## 钟鼎生物创新载体-pCzn1



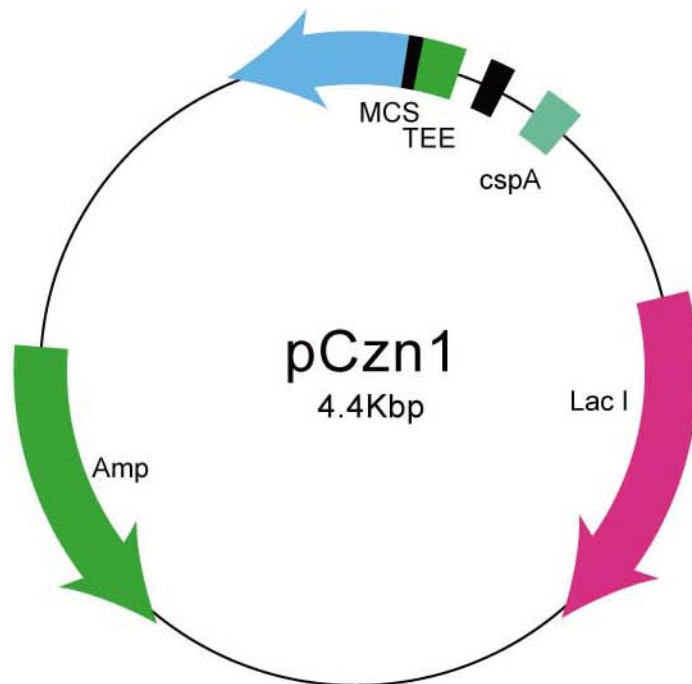
生命科学进入后基因组时代,在许多科研项目中,获得具有空间结构和生物学活性的重组蛋白是非常关键的步骤。通过E. coli体系获得重组蛋白,具有成本低、操作简便等优点,能够大幅的降低实验成本。但是大量的基因在原核系统中会由于不同种类的问题而导致无法在上清中获得可溶蛋白,例如稀有密码子含量太高而导致不表达或蛋白表达水平低、重组蛋白形成包涵体,无法在细胞上清中形成可溶蛋白等。

钟鼎生物 (www. zoonbio. com) 构建了具有低温诱导的特色原核表达载体,携带冷激蛋白cspA基因启动子,能够在11度低温诱导,促进蛋白溶解,增加可溶性蛋白表达几率。载体自身携带6xHis表签蛋白,可以使用Ni纯化体系亲和纯化获得高纯度重组蛋白。

### 载体特色

- 1、携带cspA低温诱导启动子,11度低温诱导,促进蛋白溶解,增加可溶性蛋白几率
- 2、携带SD序列,增加蛋白起始密码子翻译效率
- 3、构建TEE序列,转录增强,增加蛋白表达水平
- 4、AMP抗性筛选

F Primer: ACGCCATATCGCCGAAAGG  
R Primer: GGCAGGGATCTTAGATTCTG



#### His Tag

CATCATCATCATCATCAT						ATG	AGGCCT	GAG CTC	CTCGAG	GGATCC
						Nde I	Stu I	Sac I	Xho I	BamH I
GAATTC	AAGCTT	GTCGAC	CTGCAG	TCTAGA	TAG					
EcoR I	Hind III	Sal I	Pst I	Xba I						



## 钟鼎生物创新载体-pSumo-Mut

SUMO蛋白来源于酿酒酵母的Smt3蛋白，与哺乳动物细胞的SUMO-1同源，为泛素蛋白家族成员，蛋白理论大小为11KD，但SUMO蛋白的形成过程中会具备独特的三级构造，其表观分子量可达20KD甚至更大，通过共价键与重组蛋白融合，SUMO蛋白有助于形成活性蛋白。

钟鼎生物 (www.zoonbio.com) 构建了带有SUMO蛋白标签的原核表达载体，SUMO蛋白携带了6XHis标签，因此SUMO与目标蛋白融合后，可以通过Ni柱亲和纯化获得高纯度的蛋白。SUMO蛋白的三级结构有助于提高蛋白的溶解性，同时这种三级结构能够特异的识别SUMO蛋白酶，利用SUMO蛋白酶，能特异性的从固定的位置将SUMO与重组蛋白彻底分离，在重组蛋白的N端，不留氨基酸残基。有趣的是，SUMO蛋白酶同样带有6XHis标签，可以从酶解产物中轻易的去除。

### 载体特色

- 1、携带cspA低温诱导启动子，11度低温诱导，促进蛋白溶解，增加可溶性蛋白几率
- 2、携带SUMO融合蛋白，形成三级空间结构，有助于蛋白形成正确折叠
- 3、SUMO酶特异性切割融合蛋白，重组蛋白N端无氨基酸残留
- 4、Kan抗性筛选

F Primer: AGATTCTTGACGACGGTATTAG

R Primer: TAGTTATTGCTCAGCGGTGG

