

公司产品仅供科学研究使用、不得用于临床诊断！**商品属性：**

产品名称	规格	货号
pCold-SUMO-10His原核蛋白表达试剂盒	1 kit	A-PJ1109

描述：本试剂盒所包含的原核表达载体(pCold-SUMO-10His)是在 pCold-SUMO 载体基础上改造而成(专利)，

该载体启动子(CS Promoter)来源于南极嗜冷细菌，在低温下(15 度)才能启动蛋白的表达。低温下细菌生长缓慢，使得蛋白合成速度减慢，从而最大限度的提高了蛋白正确折叠的几率，提高了蛋白可溶性表达，增强了活性蛋白的表达比率。该表达系统所包含的 SUMO tag 可以极大地提高小分子量蛋白的表达量，而且进一步提高了蛋白的可溶表达几率。同时，TEE 信号肽可增强冷启动子调控下目的蛋白的高表达。改进后的 pCold-SUMO-10His 载体，其 SUMO 蛋白标签含有 10 个组氨酸标签（10His tag），使其结合 Ni-NTA 的能力更强。与较早版本的 pCold-SUMO 表达系统相比，pCold-SUMO-10His 表达系统在保留了原有统的蛋白可溶性能生产能力、高特异性剪切能力的情况下，对 Ni-NTA 结合能力的得到明显提高。其对 Ni-NTA 结合能力的提高，

在以下三个方面改善了生产重组蛋白的性能：

（1）提高了粗蛋白样品中目标蛋白的捕获能力，从而提高纯化产量；

（2）在蛋白纯化过程中可以使用更高浓度的咪唑进行漂洗，去杂蛋白的能力明显提升，从而获得更高纯度的重组蛋白；

（3）在重组蛋白酶切去除 SUMO 标签后，利用 Ni-NTA 去除 SUMO 标签更为彻底，获得纯度更高的无标签目标蛋白。

关于宿主菌的使用：本试剂盒配备了两种宿主表达菌感受态细胞，Lyophilized Arctic (DE3)感受态和 Lyophilized BL21(DE3) Chaprone 感受态，两种感受态均为冻干品形式可长期保存在-20℃，效价无明显下降（2~10X10e5 cfu/μg）。

通常在质粒载体的构建完成，并测序验证后，可将重组质粒转入该感受态进行蛋白表达。该宿主菌仅为蛋白表达生产用，不可以进行载体构建和质粒的提取制备。由于 pCold-SUMO 系统的高可溶性表达特性，在大多数情况下重组蛋白在 Lyophilized Arctic (DE3)感受态即可获得理想的可溶表达，因此首次实验请选用 Lyophilized Arctic (DE3)感受态宿主菌。

在 Lyophilized Arctic (DE3)感受态宿主菌可溶表达效果不理想的情况下，再选用操作相对复杂的、带有辅助折叠伴侣分子的 Lyophilized BL21(DE3)Chaprone 宿主菌，该系统可获得最佳的可溶表达。除此外，pCold-SUMO 系统在常规 BL21(DE3)、BL21(DE3)plys 等宿主菌内均可获得可观的可溶性表达。

关于蛋白酶的使用：试剂盒配备了 SUMO 蛋白酶（酵母来源，也称为 UIP 蛋白酶）和 rTEV 蛋白酶，在第一步载体构建过程中需要评估、考虑两个蛋白酶的使用策略。SUMO 蛋白酶识别蛋白结构，切割活性高、酶切完全，对于需要去除 Tag 的重组蛋白其是首选。个别情况下 SUMO 标签的结构会受到 C 端重组目标蛋白的影响，使得 SUMO 蛋白酶对重组融合蛋白的切割效率降低、甚至是无效，此时再选用 rTEV 蛋白酶进行酶切。由于 rTEV 蛋白酶识别氨基酸序列，个别重组融合蛋白会包埋识别序列，因此也会导致蛋白酶切效率下降。由于重组融合蛋白结构的无法预测性，因此在实验过程中两种蛋白酶的酶切均需要测试。无论如何，通常 SUMO 蛋白酶具有更高的效率，是首选。本试剂盒配备的 SUMO 蛋白酶可以识别 SUMO 标签结构

（SDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAFKRQKGEMDSLRFlyDGIRIQADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQIGG）切割位点位于 QIGG 之后。SUMO 蛋白酶含有双 His 标签，保证了 SUMO 蛋白酶高亲力的结合 Ni-NTA，以最大限度的去除 SUMO 蛋白酶（分子量约 26kD）。rTEV 蛋白酶可以识别 SUMO 标签后面的 Glu-AsnLeu-Tyr-Phe-Gln-Gly (ENLYFQG)氨基酸序列，并在识别位点 Gln-Gly(QG)之间进行切割，从而去除 SUMO 标签。rTEV 蛋白酶含有 6XHis 标签（分子量约 30kD），可使用 Ni-NTA 纯化介质去除。

本试剂盒配备的 pCold-SUMO-10His-Positive Plasmid 为蛋白表达阳性质粒，该质粒含有 43kD 的目标蛋白，其与 SUMO 标签（19kD）融合后分子量约为 62kD。该表达质粒在 Arctic (DE3)中即可获得良好的表达。其可以仅可做为表达、酶切实验的阳性对照品。