

淳瑶MATE枯草 表达系统

产品手册 CYV1.0-22

Product manual



天津淳瑶生物科技有限公司



022-58189200
13132599812



chunyao@tjjstbio.com



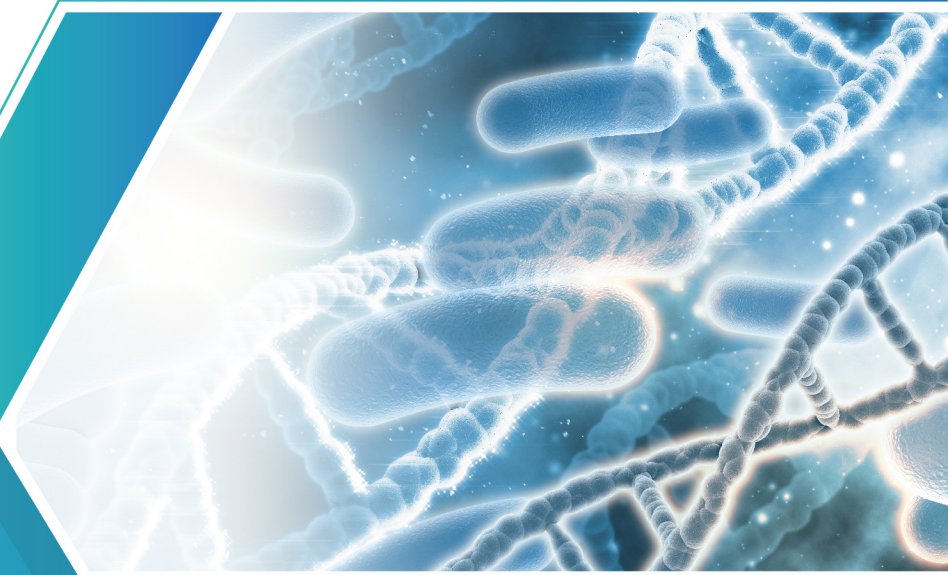
天津自贸试验区空港经济区西十五道21号
合成生物学海河实验室A401



13132599812



486229968



淳瑶生物



科技成就产业
创新永不止歇

Brochure of **CONTENTS**

一、简介 01

二、组成 04

三、枯草芽孢杆菌表达系统综述 05

四、研究示例 18

五、参考文献 24

六、常见问题和解决方案 25

附录 26

简介

MATE（麦芽糖诱导表达）枯草芽孢杆菌（*B.subtilis*）表达系统是一种可诱导表达分泌蛋白的表达系统^{1,2}。它与传统真核表达系统相比，具有周期短、表达量高、成本低和可诱导分泌蛋白表达的特点（如下表），对于错误折叠蛋白和包涵体蛋白表达等都具有独特的技术优势。同时由于MATE枯草芽孢杆菌系统具有非致病性（食品级及GRAS认证的宿主菌）、较低密码子偏爱性（不易形成包涵体）、重组表达的蛋白内毒素低、易纯化、重组表达蛋白可溶性高和较高酶活性的特点，目前已成为引领蛋白质工程等生物医药领域的一种新型工具。

MATE枯草芽孢杆菌系统广泛用于细菌、古细菌、真核生物和蛋白质（酶、药物蛋白和细胞因子）等各种来源的重组蛋白的高效表达。MATE枯草芽孢杆菌能有效克服大肠杆菌（*E.coli*）表达系统的难点，高效表达重组蛋白或者生长因子，使得MATE枯草芽孢杆菌系统的应用市场越来越广泛。

MATE枯草芽孢杆菌具有高分泌的优势和蛋白表达效率高的特点，是具有普遍适用性的枯草芽孢杆菌麦芽糖诱导表达系统，为重组蛋白的高效表达提供了一种高效工具。

常用蛋白表达系统特性比较

表达系统	发酵温度	发酵周期	生物安全	蛋白表达	表达系统	诱导条件	发酵周期	生物安全
大肠杆菌	37 °C	24-48 h	条件致病菌，存在内毒素	胞内表达	常规细菌培养基	IPTG (价格昂贵，对菌体有毒性)	胞内 2-5 g/L	最为常用的蛋白表达系统，胞内蛋白表达量高
毕赤酵母	30-32 °C (低温消耗冷却能源)	72-96 h	非食品安全菌株	分泌胞外表达	甘油	甲醇 (有损眼睛，易爆溶剂)	胞外 10-20 g/L	适合于分泌表达及带有翻译后修饰的真核蛋白
枯草 MATE 系统	37-40 °C (高温节省冷却能源)	24-60 h	FDA 认证的 GRAS 食品安全菌株	可以胞内表达，也可以分泌表达	常规细菌培养基	麦芽糖(生物安全，廉价易得)	胞内 2-5 g/L，胞外 10-20 g/L	兼具大肠杆菌和毕赤酵母系统优点，胞内外表达水平与上述系统相当

组成

麦芽糖表达载体系统（载体和宿主工程菌）

◇ 表达载体

- pMATE01: 麦芽糖诱导的高强度重组蛋白表达载体；
- pMATE02: 麦芽糖诱导的超高强度重组蛋白表达载体；
- pMATE03: 麦芽糖诱导的极高强度重组蛋白表达载体；
- pMATE04: 麦芽糖诱导的抗葡萄糖分解代谢物阻遏效应（CCR效应）高强度重组蛋白表达载体；
- pMATE05: 麦芽糖诱导高严谨性，低渗漏性重组蛋白的表达载体；
- pMATE06: 麦芽糖诱导重组蛋白可分泌表达载体，含有通用优化信号肽；

◇ 宿主细胞

- MATE01: 枯草芽孢杆菌工程菌，可以pMATE01-pMATE06质粒配合适用于外源重组蛋白的表达；
- MATE02: 枯草芽孢杆菌MATE01的工程改造菌，可以与pMATE04质粒配合适用于表达抗葡萄糖CCR效应的重组蛋白，适用于蛋白质大规模发酵培养。

枯草芽孢杆菌表达系统综述

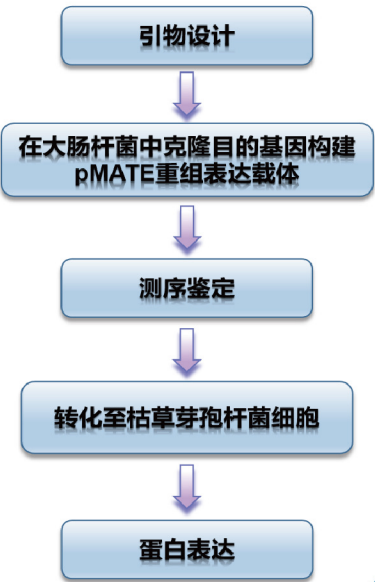
1. 表达载体简介

1) pMATE01-pMATE05

pMATE系列质粒是本公司自主研发的原核蛋白表达系统专利产品，属于枯草芽孢杆菌和大肠杆菌的穿梭克隆载体。因此，可以在大肠杆菌中克隆扩增构建表达质粒，然后将其导入枯草芽孢杆菌的感受态细胞中进行重组蛋白表达及其诱导表达条件的优化和大规模生产。

本系统把源自枯草芽孢杆菌的麦芽糖水解蛋白编码基因的malA启动子经突变提升强度后用作pMATE载体的表达启动子。由于malA启动子在大肠杆菌中并不发挥功能，因此大肠杆菌只能用于该载体的克隆与扩增。提示：malA启动子在枯草芽孢杆菌中高效表达，但当遇到目标蛋白对宿主菌有毒性作用时，可以选择高严谨性的pMATE05表达载体，以减少在未诱导条件下渗漏表达对宿主细胞的毒性影响。

重组表达流程



载体元件	位置
malA启动子	7011-7345
MCS (多克隆位点)	7361-150
Ter	151-178; 261-288
f1 ori	429-884
Amp ⁺	1051-1873
ori	2047-2638
RepB	4049-5050
Kan ⁺ /Neo ⁺	5213-5980
Ble ⁺	6200-6601

pMATE01 多克隆位点序列 (MCS) (序列展示7011-178)

5' CTTTTG...CGTCATTAAAAATTATCA AGGAGGTCGTCATCATCGTAGAAGTCTCGTTCCGAC
P_{malA}(7011-7345)
AGTTGGCATATGAGTTATGCAGTTTGTAGA ATGCAAAAAGTGAAATCAGGGGGATCCTCTAGA
Nde I(2)
GTCGAGCTCAAGCTAGCTTGGTACGTACCAGATCTGAGATCACGCGTTCTAGAGGTCGAAATT
Nhe I(69) Mlu I(99)
CACCTCGAAAGCAAGCTGATAAACCGATACAATTAA AGGCTCCTTTTGAATTAA...CTTTTT 3'
Terminator(151-178)

pMATE载体

特征	注释
载体名称	pMATE
克隆宿主	大肠杆菌
表达宿主	枯草芽孢杆菌
诱导剂	麦芽糖
纯化标签	无
抗性筛选标记 (原核生物)	卡那霉素/新霉素/博来霉素
克隆方法	大肠杆菌克隆
应用场景	pMATE 系列均适用于异源蛋白的重组表达; pMATE06 适用于分泌蛋白表达

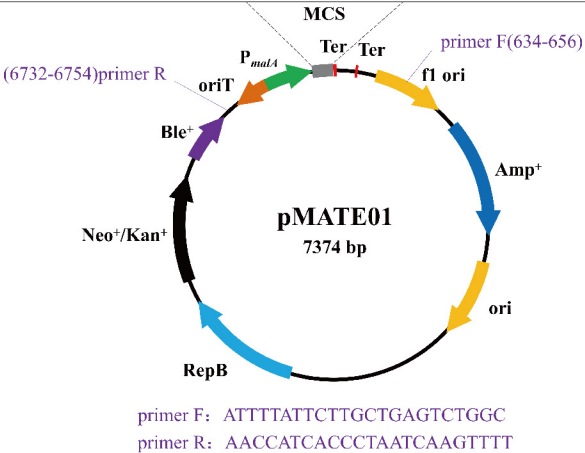


图1: pMATE01 DNA载体图谱 (7.4 kb)

载体元件

位置

malA启动子	7011-7345
MCS (多克隆位点)	7361-150
Ter	151-178; 261-288
f1 ori	429-884
Amp ⁺	1051-1873
ori	2047-2638
RepB	4049-5050
Kan ⁺ /Neo ⁺	5213-5980
Ble ⁺	6200-6601

载体元件

位置

malA启动子	7011-7345
MCS (多克隆位点)	7361-150
Ter	151-178; 261-288
f1 ori	429-884
Amp ⁺	1051-1873
ori	2047-2638
RepB	4049-5050
Kan ⁺ /Neo ⁺	5213-5980
Ble ⁺	6200-6601

pMATE02 多克隆位点序列 (MCS) (序列展示7011-178)

5' CTTTTG...CGTCATTAAATTATCA AGGAGGTCGTCATCATCGTAGAAGTCTCGTTCCGAC
P_{malA}(7011-7345)
AGTTGGCATATGAGTTATGCAGTTTGTAGA ATGCAAAAAGTGAAATCAGGGGGATCCTCTAGA
Nde I(2)
GTCGAGCTCAAGGCTAGCTTGGTACGTACCGATCTGAGATCACGCGTTCTAGAGGTCGAAATT
Nhe I(69) Mlu I(99)
CACCTCGAAAGCAAGCTGATAAACCGATACAATTAA AGGCTCCTTTTGAAATTAA...CTTTTT 3'
Terminator(151-178)

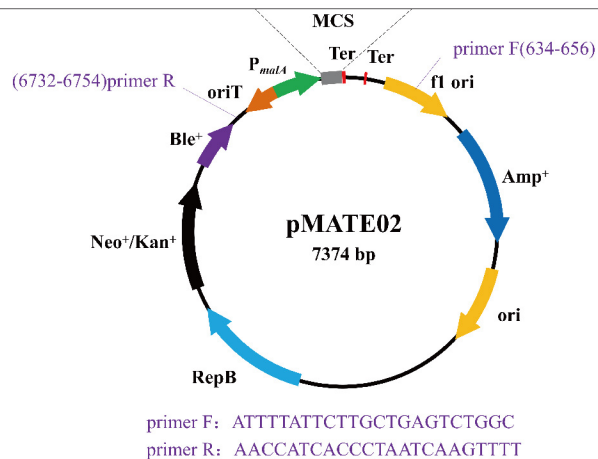


图2: pMATE02 DNA载体图谱 (7.4 kb)

pMATE03 多克隆位点序列 (MCS) (序列展示7011-178)

5' CTTTTG...CGTCATTAAATTATCA AGGAGGTCGTCATCATCGTAGAAGTCTCGTTCCGAC
P_{malA}(7011-7345)
AGTTGGCATATGAGTTATGCAGTTTGTAGA ATGCAAAAAGTGAAATCAGGGGGATCCTCTAGA
Nde I(2)
GTCGAGCTCAAGGCTAGCTTGGTACGTACCGATCTGAGATCACGCGTTCTAGAGGTCGAAATT
Nhe I(69) Mlu I(99)
CACCTCGAAAGCAAGCTGATAAACCGATACAATTAA AGGCTCCTTTTGAAATTAA...CTTTTT 3'
Terminator(151-178)

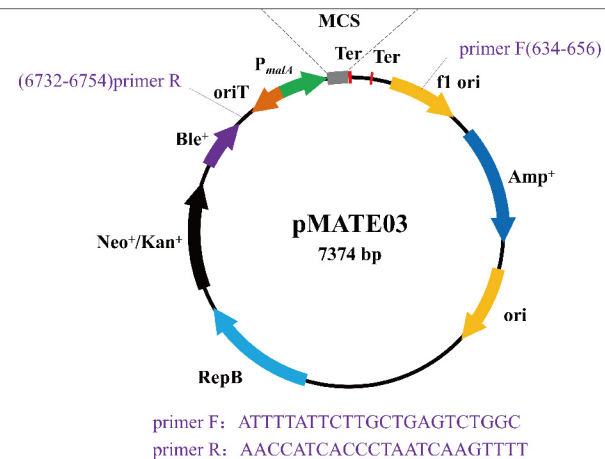


图3: pMATE03 DNA载体图谱 (7.4 kb)

载体元件

位置

malA启动子	7011-7345
MCS (多克隆位点)	7361-150
Ter	151-178; 261-288
f1 ori	429-884
Amp ⁺	1051-1873
ori	2047-2638
RepB	4049-5050
Kan ⁺ /Neo ⁺	5213-5980
Ble ⁺	6200-6601

载体元件

位置

malA启动子	7011-7215
MCS (多克隆位点)	7216-150
Ter	151-178; 261-288
f1 ori	429-884
Amp ⁺	1051-1873
ori	2047-2638
RepB	4049-5050
Kan ⁺ /Neo ⁺	5213-5980
Ble ⁺	6200-6601
荧光蛋白报告基因GFP	7484-8200

pMATE04 多克隆位点序列 (MCS) (序列展示7011-178)

pMATE05 多克隆位点序列 (MCS) (序列展示7011-178)

5' CTTTTG...CGTCATTAAATTATCA AGGAGGTCGTCATCATCGTAGAAGTCTCGTTCCGAC
P_{malA} (7011-7345)
 AGTTGGCATATGAGTTATGCAGTTTGTAGA ATGCAAAAAGTGAAATCAGGGGGATCCTCTAGA
Nde I(2)
 GTCGAGCTCAAGCTAGCTTGGTACGTACCAGATCTGAGATCACGCGTTCTAGAGGTCGAAATT
Nhe I(69) Mlu I(99)
 CACCTCGAAAGCAAGCTGATAAACCGATACAATTAA AGGCTCCTTTTGAAATTAA...CTTTTT 3'
 Terminator(151-178)

5' TTCAT...GTCATGGTACCTAAAGTACTACCTGCGCTAGCGCAGGCCAGAAGAGGCGCGTTG
P_{malA} (7011-7215) Nhe I(7237)
 CCCAAGTAACGGTGTGGAGGAGCCAGTCCTGTGATAACACCTGAGGGGGTGCATCGCCGAG
Bsu36 I(7306)
 GTGATTGAACGGCTGGCCACGTTTCATCATCGGCTACAGGGGCTGAATCCCTGGGTTGTCACC
 AGAAGCGTTCGCAGTCGGGCGTTTCGCAAGTGGTGGAGCACTCTGTATTACGAACGTGACTA
 CTTTCGATTGGCFGACFACTAGGGGGAATAATT-GFP-AGAAGTCTCGTTCCGACAGTTGGCAT
 ATGAGTTATGCAGTTTGTAGAATGCAAAAAGTGAAATCAGGGGGATCCTCTAGAGTCGAGCTCA
Bpl I(47)
AGCTAGCTTGGTACGTACCAGATCTGAGATCACGCGTTCTAGAGGTCGAAATTCACCTCGAAA
Nhe I(69) Bpl I(79) Bgl II(87) Mlu I(99)
 GCAAGCTGATAAACCGATACAAATTAA...TTTTT 3'
 Terminator(151-178)

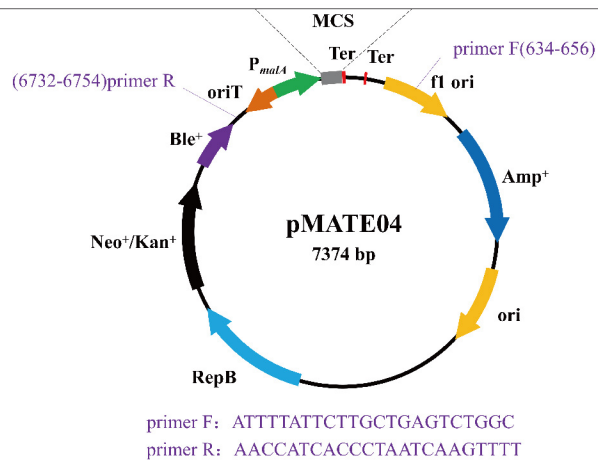


图4: pMATE04 DNA载体图谱 (7.4 kb)

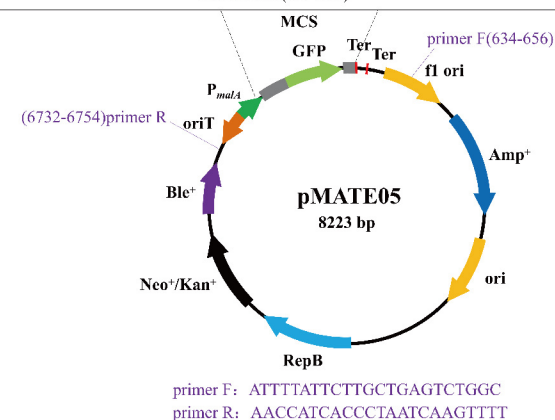


图5: pMATE05 DNA载体图谱 (8.2 kb)

2) pMATE06

质粒pMATE06基于pMATE系列载体基础上通过优化筛选构建，在MCS位点上游携带一个修饰的通用Sec型分泌信号肽序列，适用于异源重组蛋白的高效分泌表达。

载体元件	位置
malA启动子	7031-7365
SPbglS分泌信号肽 (SP)	7372-20
MCS (多克隆位点)	21-170
Ter	171-198; 281-308
f1 ori	449-904
Amp ⁺	1071-1893
ori	2067-2658
RepB	4069-5070
Kan ⁺ /Neo ⁺	5233-6000
Ble ⁺	6220-6621

pMATE06 多克隆位点序列 (MCS) (序列展示7031-198)

5' CTTTT...GTCATCATCGTATG CCT TAT CTG AAA CGA GTG TTG CTG CTT CTT GTC ACT
P_{malA}(7031-7365) M P Y L K R V L L L L V T
GGA TTG TTT ATG AGT TTG TTT GCA GTC ACT GCT ACT GCC TCA GCT CATATGAGTTATGC
G L F M S L F A V T A T A S A Nde I(22)
AGTTTGTAGAATGCAAAAAGTGAAATCAGGGGGATCCTCTAGAGTCGAGCTCAAGCTAGCTTG
Bpl I(47) Nhe I(89) Bpl I(99)
GTACGTACCAGATCTGAGATCAGCGGTTCTAGAGGTGCGAAATTCACCTCGAAAGCAAGCTGATA
Mlu I(119)
AACCAGATACAATTA...TTTTT 3'
Terminator(171-198)

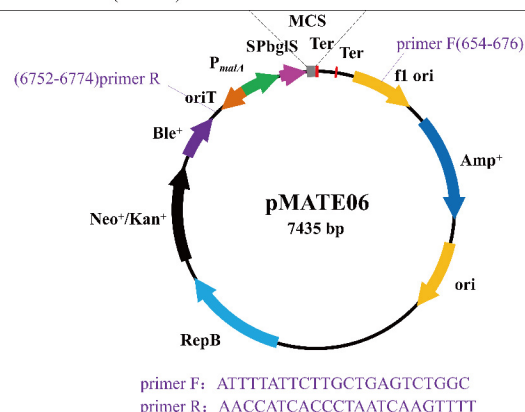


图6: pMATE06 DNA载体图谱 (7.5 kb)

2.重组表达载体的构建策略

结合pMATE载体多克隆位点、阅读框，设计引物和PCR扩增，将目的基因克隆到表达载体中。如果需要重组蛋白采用His/GST标签纯化，请在目的蛋白基因序列C端、N端或中间区域插入标签，或者同时在N端和C端插入His标签，凝血酶标签需放置在His标签外侧，具体操作请参考以下策略。

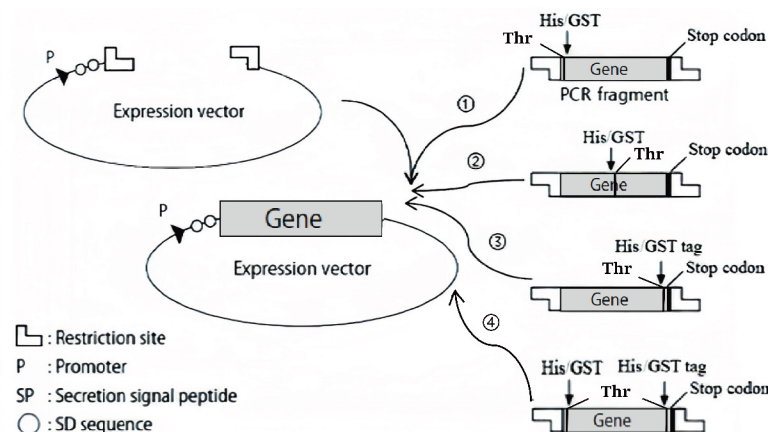


图7: 枯草芽孢杆菌pMATE01-05重组表达载体的构建

8×His Sequence: CAC CAC CAT CAC CAT CAC CAT CAC
His His His His His His His His

Thrombin Sequence: CTG GTT CCG CGT GGA TCT
Leu Val Pro Arg Gly Ser

构建pMATE06重组表达载体时目的基因需插入到分泌信号切割位点 (SP) 的下游，目的基因经过PCR扩增、纯化、双酶切、DNA连接获得重组目的基因表达质粒。作为替换的方法可以采用同源重组的方法，详细的过程可以参考同源重组试剂盒的详细步骤。

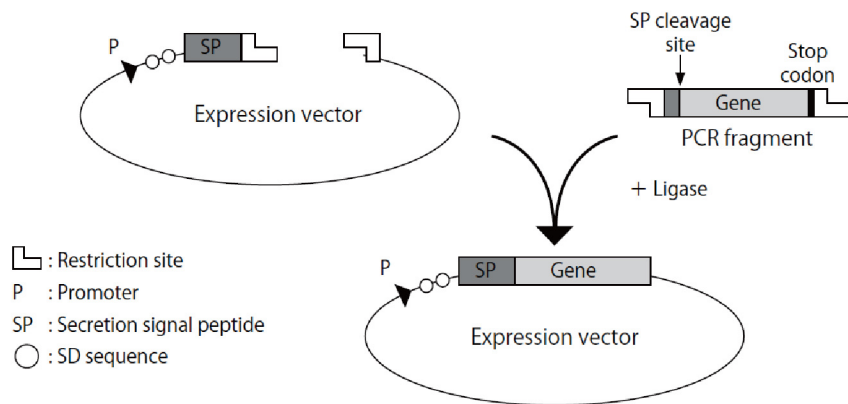


图8: 枯草芽孢杆菌pMATE06重组表达载体的构建

3. pMATE 01-06克隆载体的构建

1) 将预先制备好的大肠杆菌感受态细胞快速融化后放在冰上, 将200 -1000 ng 连接产物融化后加入感受态细胞中, 冰浴10-20 min, 42 °C热激60-90 s, 迅速于冰上静置3 min, 在热激过的感受态细胞中加入800 μ L LB培养基, 37 °C培养1 h后, 5000 rpm/min离心3 min, 弃部分上清, 重悬菌体, 将50-100 μ L菌液均匀涂布于氨苄青霉素抗性平板上, 于37 °C过夜培养 (18-24 h)。

2) 第二天挑取单个菌落加入3-5 mL LB培养基 (100 μ g/mL氨苄青霉素), 37 °C 300 rpm/min振荡培养18-24 h, 可以通过菌液PCR方法鉴定阳性克隆, 也可以提取质粒做酶切鉴定或质粒序列测序比对等方法鉴定阳性克隆并用于后续枯草系统转化 (若不能及时挑取菌落短时间内可将平板暂时放置于4 °C冰箱)。

4. 枯草芽孢杆菌的转化

1) 取一支100 μ L枯草芽孢杆菌感受态细胞 (CYA003/CYA004) 置于冰上5-10 min解冻后, 加入1 mL GM转化试剂 (CYY001) 并混匀, 于37 °C 200 rpm/min 振荡培养30 min。

2) 将50-200 ng构建好的含有重组蛋白的pMATE质粒 (CYB001/-CYB002/CYB003/CYB004/CYB005/CYB006) 与上述制备的感受态细胞混合均匀后, 继续在37 °C 200-300 rpm/min 振荡培养1.5 h。

3) 将上述菌液5000 rpm/min离心3 min, 弃部分上清, 用200 μ L GM转化试剂重悬菌体, 然后吸取50-200 μ L菌液涂布卡那霉素抗性 (20 -50 μ g/mL) 或新霉素 (20-50 μ g/mL) 抗性平板, 剩余菌液可放置在4 °C备用, 将平板倒扣放置于37 °C静置培养16-24 h。

4) 挑取单个阳性克隆接种至3-5 mL含有对应抗生素的 LB培养基于37 °C 200-300 rpm/min 振荡培养过夜, 进行阳性克隆鉴定和重组蛋白的表达分析。

5. 重组蛋白表达分析与优化

1) 麦芽糖诱导重组蛋白表达及优化

① 细菌接种: 挑取上述构建好的重组pMATE质粒的单克隆菌落到LB抗性培养基 (卡那霉素20-50 μ g/mL或新霉素20-50 μ g/mL) 中, 37 °C过夜培养 (200-300 rpm)。第二天上午把上述培养的菌液转接到LB培养基或2 $\times$ SR培养基中, 37 °C继续培养 (200-300 rpm)。

② 麦芽糖诱导: 将上述菌液37 °C 200-300 rpm振荡培养至

OD₆₀₀=0.6-0.7时，添加麦芽糖（诱导剂麦芽糖的浓度可以在0.125 %至5 %的范围内进行优化分析），37 °C继续培养24-48 h。

③ 细菌收获：当OD₆₀₀大于等于1.0时，将菌液用5000-8000 rpm/min 4 °C离心10 min，弃上清，沉淀保存-20 °C冰箱。

2) 重组蛋白的纯化：Ni-NTA树脂的结合能力依赖于蛋白质，通常在5-10 mg /mL之间。

① 细菌裂解：将菌液用5000-8000 rpm/min 4 °C离心10 min，弃上清并保留沉淀并加入细菌裂解液进行超声裂解，然后12000 rpm/min 4 °C离心，保留上清得到样品。

② 装柱：重悬介质，根据待纯化蛋白量，将适量介质加入层析柱，静置。

③ 平衡：用5-10倍体积平衡缓冲液平衡层析柱。对于结合能力强的His标签重组蛋白，或为了提高特异性结合平衡缓冲液中可加入低浓度咪唑（10-20 mM）。

④ 上样：样品缓冲液要尽可能与平衡缓冲液一致。为了避免堵塞层析柱，样品应经离心或使用0.45 μm过滤器过滤。

⑤ 洗涤：上样完毕后，用5-10倍体积平衡缓冲液平衡层析柱，收集流出液用于SDS-PAGE分析。

⑥ 洗脱：洗脱一般有两种方式。一种是用不同浓度的咪唑洗脱目的蛋白。另一种是用不同pH值平衡缓冲液洗脱目的蛋白。收集洗脱液用于SDS-PAGE分析。

3) 重组蛋白的浓缩。请参经常规蛋白浓缩与复性流程。透析袋浓缩蛋白质是应用最广的一种蛋白浓缩方法。将要浓缩的蛋白溶液放入透析袋（无透析袋可用玻璃纸代替），结扎，把高分子聚合物如聚乙二醇（碳蜡）、聚乙烯吡咯烷酮等或蔗糖撒在透析袋外即可。也可将吸水剂配成30%-40%浓度的溶液，将装有蛋白液的透析袋放入即可。吸水剂用过后，可放入温箱中烘干或自然干燥后，仍可再用。或者根据目的蛋白的分子量选择对应的浓缩管进行离心浓缩。

4) 重组蛋白电泳。灌制分离胶和浓缩胶。制备样品和上样：将蛋白质样品中加入2×蛋白电泳上样缓冲液。用涡旋振荡仪彻底混匀后100 °C加热10 min。冷却至室温再10000 rpm/min离心2-5min，最终获得蛋白电泳分析样品。将Marker、裂解液、结合滤除液、样品用微量注射器将样品垂直加入样品孔中进行通过SDS-PAGE和考马斯亮蓝染色分析，并确认重组蛋白表达的最佳条件。

5) 重组蛋白定量分析。考马斯亮蓝溶液配置：将100 mg考马斯亮蓝G-250溶于50 mL 85 %的磷酸，用蒸馏水定容至1 L。标准曲线的绘制：选择血清蛋白，稀释至合适浓度，样品浓度为0.02-0.10 g/L，在595 nm波长下测定吸光度，以A₅₉₅纵坐标，标曲蛋白位横坐标，绘制标准曲线。将待测样本溶于缓冲溶液（生理盐水）中，每个样本加入2.5 mL考马斯亮蓝染料，作用2-20 min，测定595 nm处的吸光值，根据标准曲线计算样品蛋白含量。参考BCA相对应的试剂盒说明书。

6. 麦芽糖诱导重组蛋白分泌表达分析与优化

1) 可以使用阴性对照（空穿梭载体）和阳性对照来确认目标蛋白是否表达。液体培养基中挑选表达质粒转化体（加入诱导剂麦芽糖的浓度可以在0.125 %至5 %的梯度范围内进行优化）。

2) 在37 °C摇床（200 -300 rpm）培养不超过48 h，取培养液离心分离获得培养上清，保留培养基并加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至30 %饱和度，冰上放置2-3 h，然后4 °C 12000 rpm离心10-15 min，去上清并保留沉淀，将沉淀用平衡缓冲液溶解，取上述样品加入6×上样缓冲液后在100 °C于水浴锅中煮沸5 min，冷却至室温后12000 rpm/min离心2 min，然后通过SDS-PAGE和考马斯亮蓝染色分析以确定目标重组蛋白是否表达及其表达量最佳的麦芽糖诱导浓度。如果目的重组蛋白表达量低，可以尝试扩大培养体系获得足够量的重组表达蛋白。（*一般情况下细菌内也包含大量重组蛋白，条件允许的情况下可以同时纯化细菌内的重组蛋白和培养液中的重组蛋白）。

3) 剩余的重组蛋白样品可以加入10 %的甘油分装并保存在-80 °C冰箱。

研究示例

1. α -淀粉酶表达分析

利用pMATE系统构建了 α -淀粉酶基因BLA重组表达载体，并成功高

效分泌表达BLA到枯草芽孢杆菌的培养基中。下图为菌株pMATE-BLA麦芽糖诱导培养48 h后的SDS-PAGE分析结果。红色箭头是目的重组蛋白条带。

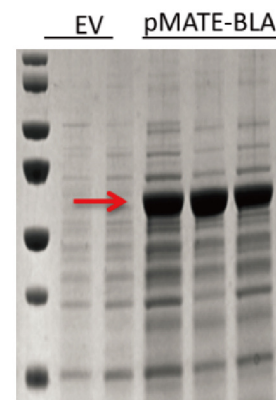


图9: α -淀粉酶表达优化分析
(EV空载体, pMATE-BLA为
 α -淀粉酶表达)

2. 聚甘露聚糖酶表达分析

利用pMATE系统构建了聚甘露聚糖酶基因ManA重组表达载体，并成功将目标蛋白分泌到枯草芽孢杆菌的培养基中。下图为菌株pMATE-ManA麦芽糖培养72 h后的SDS-PAGE分析结果。

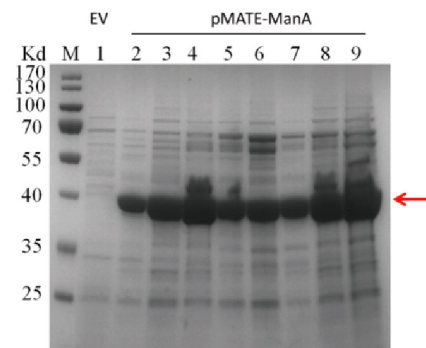


图10: 聚甘露聚糖酶表达优化分析
(EV空载体, pMATE-ManA为聚
甘露聚糖酶)

3. 异构酶表达分析

利用pMATE系统构建含有瘤胃球菌异构酶基因DPE重组表达载体，在枯草芽孢杆菌中高效表达并成功分泌到培养基中。下图为菌株pMATE-DPE培养72 h后的SDS-PAGE分析结果。

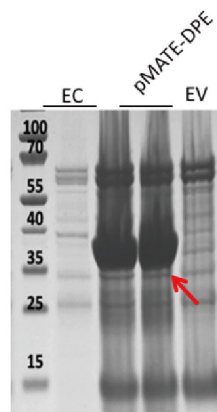


图 11: 异构酶表达分析
(EC是未诱导条件, pMATE-DPE为异构酶诱导表达, EV空载体)

4. 荧光素酶

利用pMATE系统构建了荧光素酶基因Luc重组表达载体，并在枯草芽孢杆菌细胞中高效表达了荧光素酶蛋白。下图为菌株pMATE-Luc麦芽糖诱导培养36 h后的SDS-PAGE分析结果。

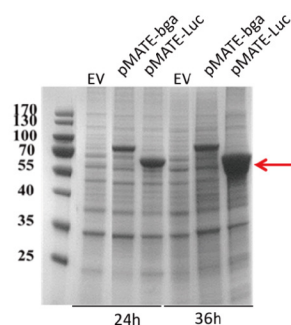


图 12: 荧光素酶表达优化分析
(EV空载体, pMATE-DPE为荧光素酶)

5. 半乳糖苷酶表达优化分析

利用pMATE系统构建了荧光素酶基因Luc重组表达载体，并在枯草芽孢杆菌细胞中高效表达了荧光素酶蛋白。下图为菌株pMATE-Luc麦芽糖诱导培养36 h后的SDS-PAGE分析结果。

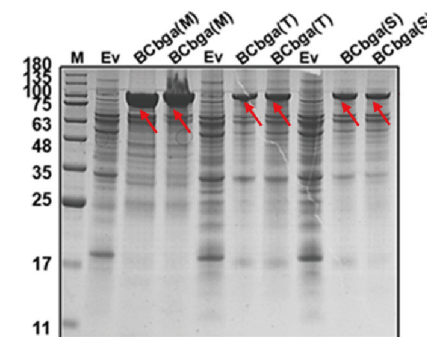


图 13: 半乳糖苷酶表达分析
(Ev空载体, pMATE-BCbga为荧光素酶, M、T和S分别为超声处理后的培养基、全细胞裂解液和上清液的组分)

6. Creatinase (Cre) & Creatininase (CK)表达分析

利用MATE构建恶臭假单胞菌属肌酐酶基因Cre和褐藻属肌酐酶基因CK重组表达载体，并成功在枯草芽孢杆菌中高效表达并分泌到培养基中。

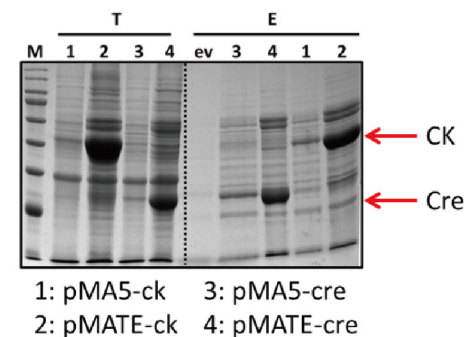


图 14: 肌苷酶和肌酐酶表达分析
(T代表全细胞裂解液, E分泌的培养基)

7. 植酸酶表达分析

利用pMATE系统构建了植酸酶基因AppA重组表达载体，在枯草芽孢杆菌中高效表达并成功分泌到培养基中。下图为菌株pMATE-AppA培养48 h后的SDS-PAGE分析结果。EV和EC分别表示含有空载体和仅含有宿主细胞的菌株。

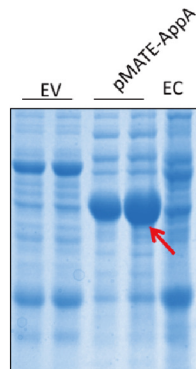


图 15: 植酸酶表达分析

(EV空载体, pMATE-AppA为植酸酶, EC为分泌的培养基)

8. 绿色荧光蛋白表达分析

通过pMATE系统构建含有绿色荧光蛋白GFP基因重组表达载体，并在枯草芽孢杆菌中成功高效表达。由于GFP蛋白高表达水平引起的细胞质胀压渗漏，表达的大量GFP蛋白至泄漏到培养基中。最后，GFP蛋白的表达水平达到了总细胞蛋白的70 %以上。下图为菌株pMATE-GFP培养36 h后的SDS-PAGE分析结果。

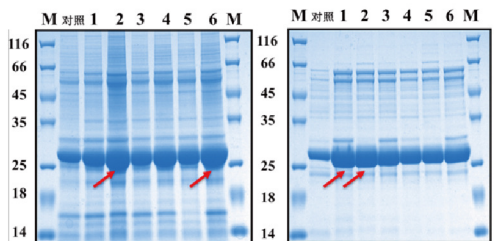


图 16: 绿色荧光蛋白表达分析

9. FGF21表达分析

pMATE系统可以表达具有二硫键的真核生物基因，通常这些细胞因子很难在原核细菌宿主细胞中表达。然而，利用pMATE系统成功诱导了FGF21在枯草芽孢杆菌中有效表达。下图为菌株pMATE-FGF21培养48 h后的SDS-PAGE分析结果。Ev表示含有空载体的菌株。

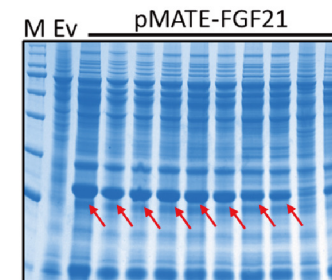


图 17: FGF21表达分析

(Ev空载体, pMATE-FGF21为细胞因子)

10. 几丁质酶表达分析

通过枯草芽孢杆菌的pMATE系统，建立了来源于环状芽孢杆菌(BCchA)胞外高产分泌几丁质酶A1的系统。下图为菌株pMATE-BCchA培养48 h后的SDS-PAGE分析结果。Ev表示含有空载体的菌株。

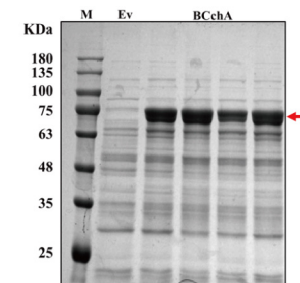


图 18: 几丁质酶A1表达分析

(Ev空载体, pMATE-BCchA为几丁质酶A1)

11. 细胞色素P450酶表达分析

pMATE系统构建了来自不同哺乳动物的P450酶，并成功在枯草芽孢杆菌中的有效表达，显著优于pET/BL21大肠杆菌表达系统。下图为枯草芽孢杆菌中6种细胞色素P450酶的表达水平。箭头表示不同P450酶的目的条带。

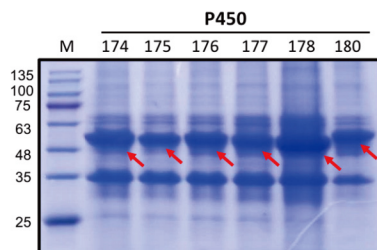


图 19: 细胞色素P450酶表达分析

参考文献

1. G. Fu, J. Yue, D. Li, Y. Li, S. Y. Lee, D. Zhang, An operator-based expression tool kit or *Bacillus subtilis* enables finetuning of gene expression and biosynthetic pathway regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **119**, 11, e2119980119 (2022).
2. C. Anagnostopoulos, J. Spizizen, Requirements for Transformation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **81**, 6-741 (1961).

常见问题和解决方案

1. 转化效率低

当未使用转化试剂或转化时振荡培养温度和时间不足将会影响转化效率。

解决方案：严格按照产品手册的步骤进行。

2. 蛋白质无/低表达

当目的蛋白不能通过蛋白质检测技术（如：Western-Blotting）检测到，或者检测到水平很低（每升培养液少于1 μg ）时，问题往往在于目标蛋白对宿主菌产生有害影响。

解决方案：当目标蛋白对宿主菌有毒性作用时，可以选择高严谨性的pMATE05表达载体，以减少在未诱导条件下渗漏表达对宿主细胞的毒性影响。

附录

附件 1:

<pMATE01-05 的载体信息>

载体元件	注释
malA 启动子	利用麦芽糖水解蛋白基因的部分 5'端序列; 在大肠杆菌中几乎没有活性; 在枯草芽孢杆菌中强烈表达。
MCS (多克隆位点)	11 个限制性内切酶切割位点
Ter	位于多克隆位点下游的长度为 46 bp 的终止子结构
fl ori	该质粒在大肠杆菌中的复制起点(来自 pUC)
Amp ⁺	大肠杆菌中氨苄青霉素抗性基因的选择标记
ori	质粒在枯草芽孢杆菌中的复制来源(来自 pUB110)
RepB	质粒复制相关的基因(来自 pUB110)
Kan ⁺ /Neo ⁺ /Ble ⁺	卡那霉素、新霉素抗性基因、博来霉素抗性基因 枯草芽孢杆菌的选择标记

附件 2:

<pMATE06 质粒信息>

载体元件	注释
malA 启动子	利用麦芽糖水解蛋白基因的部分 5'端序列; 在大肠杆菌中几乎没有活性; 在枯草芽孢杆菌中强烈表达。
SPbglS分泌信号肽 (SP)	一种改良的 Sec 型分泌信号以增加多功能性
MCS (多克隆位点)	11 个限制性内切酶切割位点
Ter	位于多克隆位点下游的长度为 46 bp 的终止子结构
fl ori	该质粒在大肠杆菌中的复制起点(来自 pUC)
Amp ⁺	大肠杆菌中氨苄青霉素抗性基因的选择标记
ori	质粒在枯草芽孢杆菌中的复制来源(来自 pUB110)
RepB	质粒复制相关的基因(来自 pUB110)
Kan ⁺ /Neo ⁺ /Ble ⁺	卡那霉素、新霉素抗性基因、博来霉素抗性基因 枯草芽孢杆菌的选择标记

附件 3:

<产品套装目录>

货号	产品名称	试剂名称 (英文)	试剂名称 (中文)	规格	特点和优势
CYA101	MATE01 枯草芽孢杆菌套装 (含赠品)	MATE01 (赠品: MATE01 Competent Cells, GM)	MATE01 枯草芽孢杆菌 (赠品: MATE01 枯草芽孢杆菌感受态, GM 转化试剂)	1× (100 μL/支) 10× (100 μL/支) 1× (20 mL/瓶)	生长快, 培养简单, 蛋白表达 (或分泌) 量大, 无内毒素/LPS, 抗杂菌污染性强, 属于食品、饲料级安全菌种。 储存条件: 菌株: -80 °C 感受态: -80 °C 转化试剂: 4 °C
CYA102	MATE02 枯草芽孢杆菌套装 (含赠品)	MATE02 (赠品: MATE02 Competent Cells, GM)	MATE02 枯草芽孢杆菌 (赠品: MATE02 枯草芽孢杆菌感受态, GM 转化试剂)	1× (100 μL/支) 10× (100 μL/支) 1× (20 mL/瓶)	生长快, 培养简单, 蛋白表达 (或分泌) 量大, 无内毒素/LPS, 抗杂菌污染性强, 属于食品、饲料级安全菌种。与 pMATE04 质粒搭配使用, 消除葡萄糖 CCR 效应影响。 储存条件: 菌株: -80 °C 感受态: -80 °C 转化试剂: 4 °C

货号	产品名称	试剂名称 (英文)	试剂名称 (中文)	规格	特点和优势
CYA103	MATE01 枯草芽孢 杆菌感受 态套装	MATE01 <i>Competent Cells</i>	MATE01 枯草 芽孢杆菌感受 态	100× (100 μL/ 支)	转化效率高, 自身可分泌 抗菌物质抵抗杂菌污染, 无内毒素/LPS, 属于食 品、饲料级安全菌种。 储存条件: -80 °C
CYA104	MATE02 枯草芽孢 杆菌感受 态套装	MATE02 <i>Competent Cells</i>	MATE02 枯草 芽孢杆菌感受 态	100× (100 μL/ 支)	自身可分泌抗菌物质抵抗 杂菌污染, 无内毒素 /LPS, 属于食品、饲料级 安全菌种。与 pMATE04 质粒搭配使用, 消除葡萄 糖 CCR 效应影响。 储存条件: -80 °C
CYB101	pMATE 枯 草芽孢杆 菌表达载 体套装	pMATE01 pMATE02 pMATE03 pMATE04 pMATE05 pMATE06	pMATE01-06 枯草芽孢杆菌 表达载体	1× (5 μg/支) 1× (5 μg/支) 1× (5 μg/支) 1× (5 μg/支) 1× (5 μg/支) 1× (5 μg/支)	MATE 系列质粒能满足 高强度/高严谨/耐葡萄糖/高 分泌等多种不同的需求。 储存条件: -20 °C

货号	产品名称	试剂名称 (英文)	试剂名称 (中文)	规格	特点和优势
CYC101	淳瑶 MATE 枯 草芽孢杆 菌表达系 统组合套 装 1	MATE01 <i>Competent Cells</i> pMATE01 pMATE02 GM	MATE01 枯草 芽孢杆菌感受 态 pMATE01-02 枯草芽孢杆菌 表达载体 转化试剂	20× (100 μL/ 支) 1× (5 μg/支) 1× (5 μg/支) 1× (20 mL/ 瓶)	适用于常规蛋白表达项目 (推荐常用款)。 储存条件: 感受态: -80 °C 表达载体: -20 °C 转化试剂: 4 °C
CYC102	淳瑶 MATE 枯 草芽孢杆 菌表达系 统组合套 装 2	MATE01 <i>Competent Cells</i> pMATE05 pMATE06 GM	MATE01 枯草 芽孢杆菌感受 态 pMATE05-06 枯草芽孢杆菌 表达载体 转化试剂	20× (100 μL/ 支) 1× (5 μg/支) 1× (5 μg/支) 1× (20 mL/ 瓶)	具有高严谨性, 低渗漏性 特点, 适用于包涵体蛋白 表达。 储存条件: 感受态: -80 °C 表达载体: -20 °C 转化试剂: 4 °C
CYC103	淳瑶 MATE 枯 草芽孢杆 菌表达系 统组合套 装 3	MATE02 <i>Competent Cells</i> pMATE03 pMATE04 GM	MATE02 枯草 芽孢杆菌感受 态 pMATE03-04 枯草芽孢杆菌 表达载体 转化试剂	20× (100 μL/ 支) 1× (5 μg/支) 1× (5 μg/支) 1× (20 mL/ 瓶)	具有超高表达、葡萄糖耐 受特点, 适用于大规模发 酵生产大量蛋白质。 储存条件: 感受态: -80 °C 表达载体: -20 °C 转化试剂: 4 °C

附件 4:

LB培养基 (pH 7.0; 总体积1L)

酵母提取物	5 g/L
胰蛋白胨	10 g/L
NaCl	10 g/L

2×SDS PAGE 上样缓冲液 (pH 6.8; 总体积1L)

Tris-HCl	1.25 mL
SDS	0.5 g/L
BPB	25 mg/L
甘油	2.5 mL

6×SDS PAGE 上样缓冲液 (pH 6.8; 总体积1L)

Tris-HCl	3.75 mL
SDS	1.5 g/L
BPB	75 mg/L
甘油	7.5 mL

细菌裂解液 (pH 8.0; 总体积1L)

50 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	6.90 g/L
300 mM NaCl	17.54 g/L
10 mM 咪唑	0.68 g/L
10 mM Tris base	5 mL

可溶性蛋白平衡缓冲液 (pH 8.0; 总体积1L)

50 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	6.90 g/L
300 mM NaCl	17.54 g/L
10 mM 咪唑	0.68 g/L
10 mM Tris base	5 mL

包涵体蛋白平衡缓冲液 (pH 8.0; 总体积1L)

100 mM NaH ₂ PO ₄	11.98 g/L
10 mM Tris base	1.21 g/L
8 M 尿素或6 M GuHCl	480.5 g/L

