

透析式大肠杆菌无细胞重组蛋白表达试剂盒

货号：PMK2020

储存方式：-80 °C 保存，有效期 12 个月。

规格次数：5T

产品简介：

与传统基于活细胞的胞内蛋白表达体系相比，无细胞重组蛋白合成（CFPS）平台以完全体外重构的转录-翻译级联为核心，显著简化了实验流程，同时赋予研究者对反应体系温度、pH、氧化还原环境、离子强度及底物浓度等关键参数的精确控制能力。由于反应在开放体系中进行，用户无需顾虑细胞膜的完整性、宿主毒性或质粒拷贝数波动等生物学瓶颈，可直接向反应体系中补充能量再生组分、分子伴侣、折叠酶、稳定剂以及同位素或荧光标记物，从而实现高通量、可编程且高度可重复的蛋白质合成。

普美生物基于多年蛋白表达与纯化经验，推出新一代 CFPS 系统。该系统以经过深度优化的原核细胞裂解液为骨架，额外混合了 T7 RNA 聚合酶、能量再生酶系、能量底物（ATP、GTP、UTP、CTP）、氨基酸混合物、镁离子、钾离子及还原剂等，提供了“即开即用”的一管式解决方案，确保从模板 DNA 到功能性蛋白仅耗时数小时。在透析式 CFPS 反应中（Figure 1），实验人员首先需制备高纯度模板 DNA：既可采用经典碱裂解法大量提取超螺旋质粒，亦可直接使用试剂盒附带的高保真 PCR 预混液，通过 PCR 快速获得含 T7 启动子、核糖体结合位点（RBS）及终止子的线性模版，该策略省去了繁琐的克隆与转化步骤。随后，在无菌无核酸酶的微量离心管中建立 CFPS 反应，并转移至附送的微型透析装置中，随后将该装置置于 10 倍体积的透析外液中。该缓冲液含有高浓度氨基酸、核苷三磷酸、能量再生底物及缓冲盐离子等。透析膜允许小分子化合物自由扩散，而核糖体、酶复合物、DNA 及新生多肽则被限制在反应腔内，实现底物持续供给与代谢副产物（如无机磷酸盐、ADP、焦磷酸盐）的同步移除，从而将反应时间延长至 12 - 48h，蛋白产量提升 5 - 20 倍，可溶性蛋白比例显著增加。

此外，该透析式平台兼容多种下游应用：通过引入硒代甲硫氨酸或¹⁵N/¹³C 标记氨基酸，可高效制备同位素标记蛋白用于 NMR 结构解析；在反应体系中加入表面活性剂或纳米圆盘（nanodisc）组装组分，可实现膜蛋白的正确折叠与稳定；结合连续交换式反应器（CECF）或微流控芯片，可实现毫升级甚至升级规模的平行放大，满足药物筛选、疫苗研发及功能酶库构建的迫切需求。

*本试剂盒不适合具有译后修饰蛋白的表达；采用本试剂盒完成膜蛋白表达、同位素标记等复杂操作的，请联系我方客服了解具体情况。

CONTINUOUS EXCHANGE

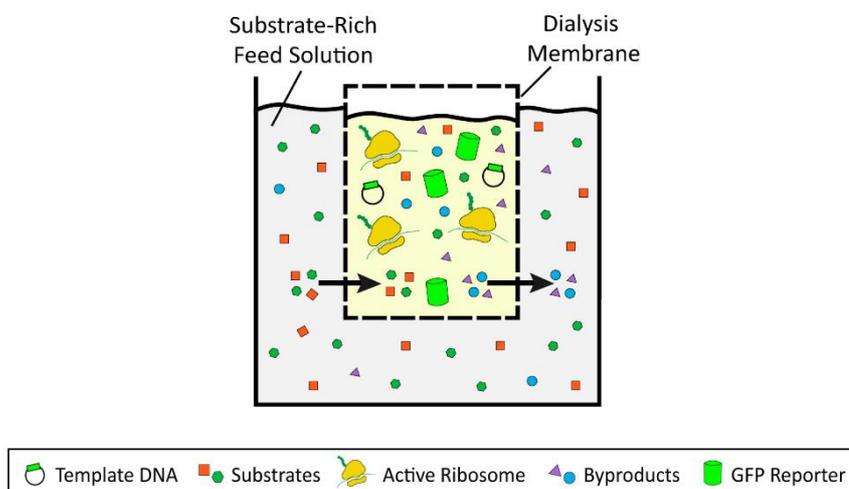


Figure 1: 透析式大肠杆菌无细胞蛋白合成原理示意图

产品说明书

DNA 模板制备:

适用于本体外重组蛋白合成体系的 DNA 模板来源可为:

- (1) 试剂盒配套的 PCR 扩增片段 (见具体操作步骤);
- (2) 质粒 DNA, 须通过中提或大量抽提获得, 且经检测不含 DNase 与 RNase 活性。

该模板 (**Figure 2**) 需按 5' → 3' 方向顺次携带: T7 启动子、位于 ATG 起始密码子上游的核糖体结合位点 (RBS)、起始密码子 ATG、终止密码子以及 T7 终止子。推荐在目标蛋白编码区融合亲和和标签 (例如 6×His 或 GST), 以简化后续纯化步骤。鉴于本系统源自大肠杆菌裂解液, 模板制备前应对序列进行密码子优化并去除潜在的内含子。

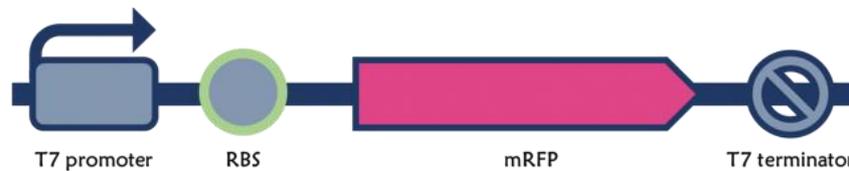


Figure 2: 用于本 CFPS 试剂盒的 DNA 模板的举例。

试剂盒提供两套 PCR 预混液 (PCR1 Mix 与 PCR2 Mix), 专用于扩增已插入 T7 启动子及终止子的 DNA 片段 (如 pET 系列载体中的靶基因)。每管预混液均含高保真聚合酶、dNTP 及对应引物; 引物序列分别与 T7 启动子与终止子区域重叠。实验者仅需加入少量提取质粒即可启动目标片段的指数扩增。扩增结束后, 将 PCR1 与 PCR2 产物等量合并, 并于 100° C 孵育以失活聚合酶; 随后缓慢冷却至室温, 所得混合物可直接投入无细胞蛋白合成反应, 无需进一步纯化。

结果分析:

下图 (**Figure 3**) 是无细胞重组蛋白合成 GFP 蛋白的 SDS-PAGE 分析展示。

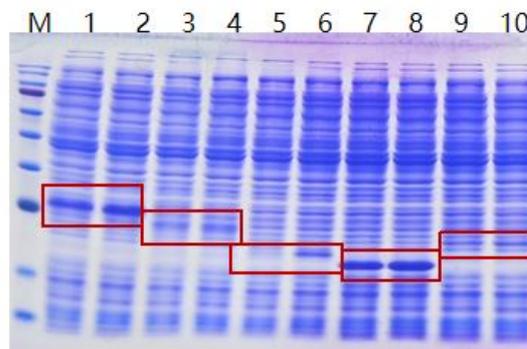


Figure 3: SDS-PAGE (15%) 对利用 CFPS 对不同重组蛋白 (泳道 1-10) 表达后的分析, 红色标记为目标蛋白。

产品内容:

除了透析袋外, 所有试剂盒中的组分都应储存在 -80°C。在反应前将所有低温保存的组分放在冰上解冻。反复冻融会明显降低组分活性和蛋白表达效果, 应尽量避免。如需多次使用同一组分, 建议在第一次解冻后将各组分分装入灭菌的小管中, 再用液氮速冻并放入 -80°C 中保存。

透析式大肠杆菌无细胞蛋白合成试剂盒

每个试剂盒可提供 5 × 200 uL 反应。

- 150 uL 大肠杆菌破碎液 (E. coli cell extract) ①
 - 350 uL 反应预混液 (Reaction mix) ②
 - 10 mL 透析外液 (Outer mix) ③
-

- 40 uL 对照 DNA 模板 (Control template DNA; *编码 GFP) ④
- 500 uL 稀释用缓冲液 (Dilution buffer) ⑤
- 195 uL PCR1 反应预混液*
- 195 uL PCR2 反应预混液*
- 19 uL Z1 高保真 DNA 聚合酶
- 5 uL Z2 超保真 DNA 聚合酶
- 5 × 透析袋 (Dialysis tubes)

***内含 dNTP、引物、Mg²⁺和缓冲液等。**

用户需准备材料:

- ◆ 去 DNA 酶与 RNA 酶的 0.5 mL 离心管或 1.5 mL 离心管;
- ◆ 高压灭菌纯水;
- ◆ 30℃ 培养箱或温控摇床;
- ◆ 低温台式小型离心机;
- ◆ SDS-PAGE 凝胶电泳;
- ◆ 包含目标蛋白 DNA 序列的模板 DNA(如选择直接采用质粒作为模板, 请采用 Maxiprep DNA 质粒, 不可采用 Miniprep 质粒; 如选择采用本试剂盒包含的 PCR 反应作为模板, 请阅读以下 PCR 操作步骤)。

使用说明:

Z-PCR 操作步骤 (如采用中提或大量提取质粒作为模板, 可跳过此步骤):

1. PCR 反应建立:

*注意: 以下 PCR 反应只可扩增插入 T7 启动子和终止子 (如 pET 载体) 中的目的基因。

PCR 反应 1*		PCR 反应 2*	
190 uL	PCR1 反应预混液 (不含聚合酶)	190 uL	PCR2 反应预混液 (不含聚合酶)
8 uL	Z1 高保真 DNA 聚合酶或	8 uL	Z1 高保真 DNA 聚合酶或
2 uL	Z2 超保真 DNA 聚合酶	2 uL	Z2 超保真 DNA 聚合酶
2 uL	DNA 质粒模板 (>50 ng/uL)	2 uL	DNA 质粒模板 (>50 ng/uL)
x uL	纯水	x uL	纯水
共 200 uL (可根据需要减少 PCR 反应量)		共 200 uL (可根据需要减少 PCR 反应量)	

*可根据需要减少 PCR 反应量, 建议客户第一次使用该试剂盒时先进行小规模 PCR 实验对 PCR 条件及聚合酶的选用进行优化, 务必选用产量高且均一的 PCR 产物进行下游蛋白表达;

*建议将 PCR 分装成 50 uL/管进行 PCR 反应;

*注意: 用户放入 PCR 反应 1 和 PCR 反应 2 中的 DNA 质粒模板必须为相同模板。

2. 建议 PCR 反应条件:

步骤	温度	时间
1 Cycle	95℃	3 min

26-33 Cycles	95°C 52-60°C 72°C	30s 15-30s 25 s/kb (Z2 超保真 DNA 聚合酶) 或 60 s/kb (Z1 高保真 DNA 聚合酶)
1 Cycle	72°C	3 min
	4-10°C	∞

3. 通过琼脂糖凝胶电泳检验该 PCR 产物 (PCR 产物应产量高且均一)
4. 将 PCR 反应 1 和 PCR 反应 2 以 1:1 比例混合;
5. 放入 $\geq 95^{\circ}\text{C}$ 水浴或其他热源中静置 8 分钟;
6. 缓慢 (可将热源断电使其自然降温) 降温至室温;
7. 可直接用于无细胞蛋白表达, 或放入 -20°C 待以后使用。

建立 5 × 200 uL 无细胞蛋白表达反应:

1. 将 -80°C 下储存的试剂盒组件放在冰上解冻;
2. 按以下描述在冰上建立反应:

❖ **反应内液: 按以下描述将各反应组件混合:**

组件	用户反应(×3)	阴性对照反应 (×1; 可选)	阳性对照反应 (×1)
反应预混液 (Reaction mix) ②	69 uL	69 uL	69 uL
模板 DNA ④	16 ng/uL 大提质粒 DNA 或 40-70 uL Z-PCR 产物	0	40 uL
大肠杆菌提取液 (<i>E. coli</i> cell extract) ① 使用前请吹打混匀!	30 uL	30 uL	30 uL
加稀释用缓冲液 (Dilution buffer) ⑤直至	200 uL	200 uL	200 uL

❖ **反应外液: 按以下描述将透析外液 (Outer mix) 分装至自带外液管:**

组件	用户反应 (×3)	阴性对照反应	阳性对照反应
加透析外液 (Outer mix) ③至	2 mL	2 mL	2 mL

3. 将该透析装置置于盛有反应外液的外液管并旋上盖子;
4. 将反应内液充分混合后, 离心数秒钟, 使管壁上残留的液体流入离心管部;
5. 转移反应内液至提供的透析袋内, 并盖上盖子;
6. 置于 30°C , 大约 100rpm 震荡过夜;
7. 将透析装置内的反应液转移至灭菌离心管内, 并取 5uL 样品加 5uL 蛋白上样缓冲液标记为总蛋白,
8. 剩余样品离心 4°C , 14000rpm, 10min, 将上清液转移至灭菌离心管内, 取上清液 5uL 加 5uL 蛋白上样缓冲液标记为上清;
9. 取 4uL 样品用 SDS-PAGE 凝胶电泳或 Western Blotting 检查目标蛋白是否表达。

产品说明书

注意事项：

1. 该反应对核酸酶非常敏感，因此请务必全称佩戴手套，并采用去核酸酶的溶剂，枪头和离心管。
2. 模板 DNA 的纯度和浓度对该反应至关重要，因此请务必在反应前检查并确认 DNA 模板样品的质量。模板 DNA 不能为小提（Miniprep）样品。
3. 建议做 200 uL 阴性对照反应，用其跟用户反应或阳性对照反应对比，进而确认目的蛋白或对照蛋白是否表达。

相关产品：

PMK2021 非透析式大肠杆菌无细胞重组蛋白表达试剂盒

PMK2022 透析式麦胚无细胞重组蛋白表达试剂盒

PMK2023 透析式烟草无细胞重组蛋白表达试剂盒

更多产品详情了解，请关注公众号：

