

透析式麦胚无细胞重组蛋白表达试剂盒

货号：PMK2022

储存方式：-80℃保存，有效期 12 个月。

规格次数：5T

产品简介：

无细胞重组蛋白表达系统和传统的细胞内蛋白质表达系统相比，具有操作方便，可控性高的特点。该系统可以将转录产物（mRNA）在细胞外的环境中有效的进行翻译。

麦胚无细胞重组蛋白表达系统利用了小麦胚芽提取物来完成上述过程。该细胞提取物含有翻译所需要的“元件”，包括核糖体、蛋白翻译因子、氨酰 tRNA 合成酶、tRNA 和蛋白质表达所需的其它组分。

在一个标准的 GZL 透析式无细胞重组蛋白表达反应中，用户需要将模板 mRNA（需含有植物翻译元件）、细胞提取液和其他必须的组分混合在一起放入透析装置内，并放入特定的缓冲液中。缓冲液中的小分子，包括氨基酸、核苷酸、ATP 和其他因子会与透析装置内的小分子进行交换，促进和提高蛋白质产量。

下图解释了一个透析式无细胞蛋白表达反应的基本设置（Figure 1）。

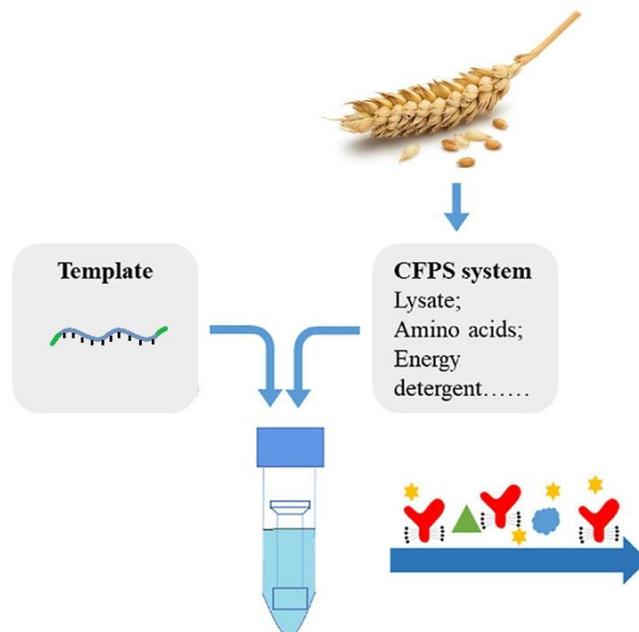


Figure 1: 透析式麦胚无细胞重组蛋白表达反应示意图

无细胞重组蛋白表达系统有着诸多的应用：

- (1) 膜蛋白表达；
- (2) 同位素标记；
- (3) 毒性蛋白表达；
- (4) 高通量蛋白表达。

产品内容：

除透析装置外，所有试剂盒中的组分都应储存在-80℃。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离心管中，再用液氮速冻并放入-80℃中保存。

透析式麦胚无细胞重组蛋白表达试剂盒

每个试剂盒可提供 5 × 200 uL 反应。

- 200 uL 细胞提取液 (Wheat Germ Cell Extract) ①
- 300 uL 反应预混液 (Wheat Germ Reaction Mix) ②
- 10 mL 透析外液 (Wheat Germ Outer Mix) ③
- 60 uL 对照 mRNA 模板 (Wheat Germ Control mRNA) ④*
- 5 × 透析装置 (Dialysis System; 含透析装置及外液管)

*含 His-6-GFP 荧光蛋白基因, 便于下游 western blotting 或荧光检测

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;
- ◆ 高压灭菌超纯水;
- ◆ 25 ° C 温控摇床或水浴摇床;
- ◆ 低温台式小型离心机;
- ◆ SDS-PAGE 凝胶电泳;
- ◆ 选: 蛋白纯化装置和耗材, 包括 Ni-NTA 柱、GSTrap 柱等;
- ◆ mRNA 模板 (需含有植物翻译元件; 浓度>300 ng/uL)

使用说明:

mRNA 模板制备:

该模板 mRNA 至少需要一个 Tobacco mosaic virus leader sequence 或 IRES 或其他植物类似元件、ATG 起始密码子(ATG start codon)、和一个终止密码子(stop codon)。建议使用 T7 或 SP6 等原核启动子进行上述 mRNA 的体外合成 (本试剂盒不提供, 需另行购买), 以提高产量。

建议在目标蛋白序列上加上亲和标签 (如 6×His 标签或 GST 标签), 便于蛋白表达后的纯化和鉴定 (例如 western blotting 或 ELISA)。由于该无细胞蛋白表达系统基于真核开发, 建议用户在制备 DNA 模板时做好内显子去除等工作。

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 (每个反应)	对照反应
反应预混液 (Wheat Germ Reaction Mix) ②	60 uL	60uL
模板 mRNA (>300 ng/uL 浓度)	60 uL	60 uL 灭菌超纯水 (或 60 uL Wheat Germ Control mRNA④)
细胞提取液 (Wheat Germ Cell Extract) ① 使用前请混匀!	40 uL	40 uL
加灭菌超纯水直至	200 uL	200 uL

反应外液：按以下描述将透析外液（Wheat Germ Outer Mix）分装至外液管

组件	用户反应（×4）	阴性对照反应
透析外液（Wheat Germ Outer Mix） ^③	2 mL	2 mL

3. 将反应内液充分混合后，离心 5 秒钟，使管壁上残留的液体流入离心管部；
4. 转移反应内液至提供的透析装置内；
5. 将该透析装置置于盛有反应外液的外液管并旋上盖子；
6. 置于 25℃（不同蛋白的最适表达温度相差较大，需要进行筛选）恒温摇床或水浴低速震荡 24 小时以上；
7. 将透析装置内的反应液转移至灭菌离心管内，用户可选择直接用其进行下游实验，或低温保存；建议取 15-20 uL 反应液（总蛋白）和离心后上清样品（≥ 14 000 g，4℃，10 分钟），添加 SDS-PAGE 上样缓冲液并煮沸，用 WB 蛋白免疫印记检查目标蛋白表达情况和溶解度。

注意：

1. 该反应对核酸酶非常敏感，因此请务必全程佩戴手套，并采用去核酸酶的溶剂，枪头和离心管；建议用户第一次试验时进行 200 uL 阴性对照反应，用其跟用户反应对比，进而确认目的蛋白是否表达。

反应建立步骤简图：

1、反应内液准备

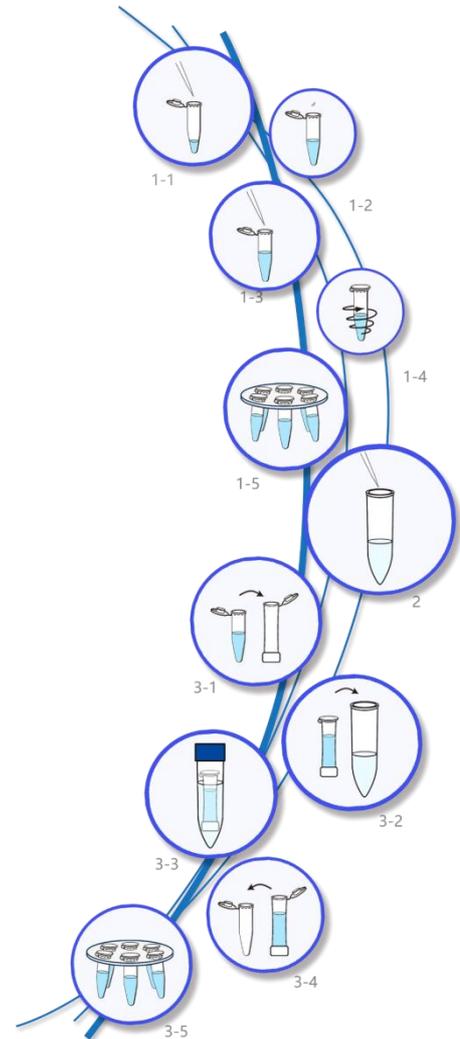
- 1-1 加入反应预混液和细胞提取液
- 1-2 加入模板 mRNA
- 1-3 加入稀释缓冲液
- 1-4 混匀
- 1-5 离心 5 秒

2、反应外液准备

- 2-1 加入透析外液于外液管（为平底；请以实物为准）中

3、反应建立

- 3-1 反应内液转移至透析装置内
- 3-2 将透析装置置于外液管中
- 3-3 25℃（震荡）过夜
- 3-4 反应液转移至灭菌离心管
- 3-5 离心（取上清和沉淀样品进行下游鉴定）



相关产品：

PMK2020 透析式大肠杆菌无细胞重组蛋白表达试剂盒
PMK2021 非透析式大肠杆菌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：

