

透析式烟草无细胞重组蛋白表达试剂盒

货号：PMK2023

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。

GZL Bioscience 开发的 TOB 无细胞重组蛋白表达系统利用了烟草细胞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）。

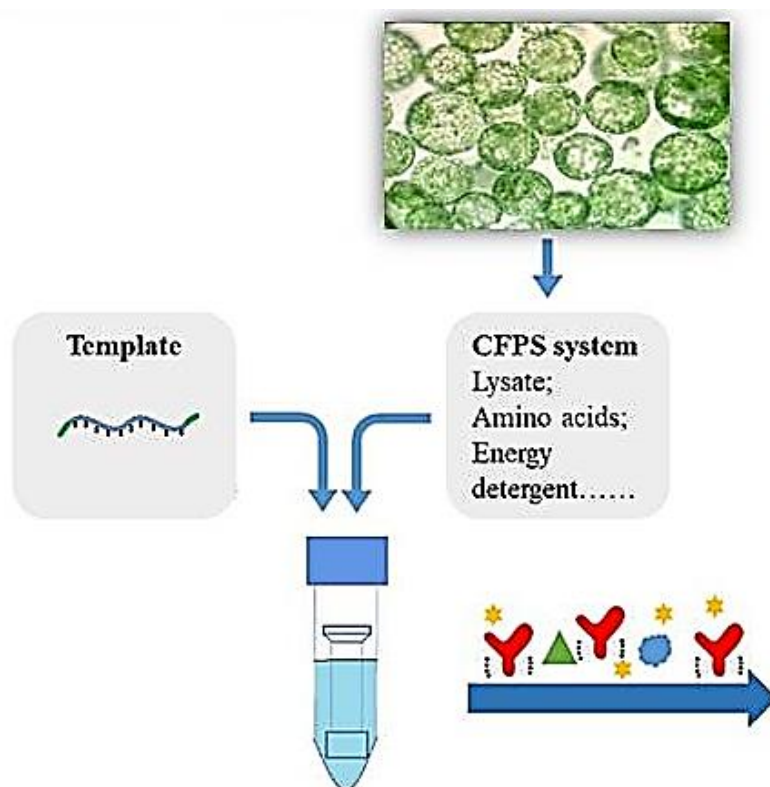


Figure 1: 透析式烟草无细胞重组蛋白表达反应示意图

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。

产品说明书

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 ° 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离心管中,再用液氮速冻并放入-80 ° C中保存。

透析式烟草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 (TOB Cell Extract) ①
- 300 uL 反应预混液 (TOB Reaction Mix) ②*
- 10 mL 透析外液 (TOB Outer Mix) ③
- 400 uL 稀释用缓冲液 (Dilution Buffer) ④
- 5 × 透析装置 (Dialysis System; 含透析装置及外液管)

*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烟草植物开发, 建议用户在制备 DNA 模板前做好密码子优化(表达宿主: *Nicotiana tabacum*)和内显子去除等工作。

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(×4)	阴性对照反应
反应预混液 (TOB Reaction Mix) ② 使用前请混匀!	60 uL	60 uL
模板 mRNA (>300ng/uL 浓度)	60 uL (也可分多次少量添加, 每次间隔 3h 左右)	60 水

细胞提取液 (TOB Cell Extract) ① 使用前请混匀!	40 uL	40 uL
加稀释用缓冲液 (Dilution Buffer) ④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 (TOB 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° C 恒温摇床或水浴低速震荡 24-48 小时；

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 3 - 5 uL 反应液（总蛋白）和离心后上清样品（≥ 14 000 g，4° C，10 分钟），添加 SDS-PAGE 上样缓冲液并煮沸，用 SDS-PAGE 凝胶电泳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

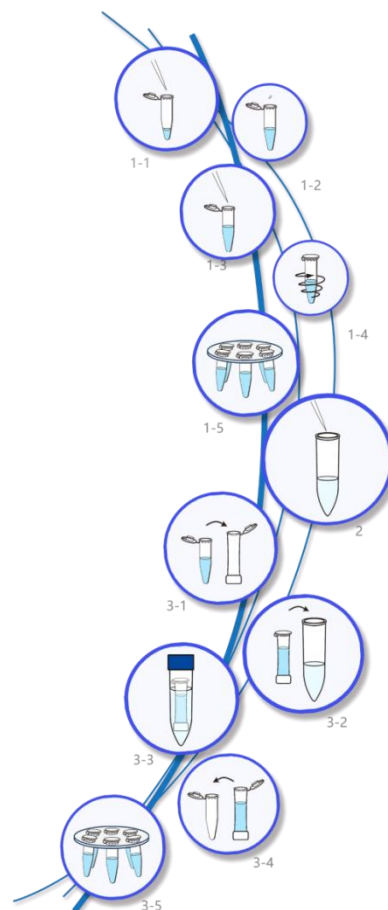
3-1 反应内液转移至透析装置内

3-2 将透析装置置于外液管中

3-3 25°C（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
PMK2022 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：

