

GZL 无细胞重组蛋白合成试剂盒（操作步骤）

简介

无细胞重组蛋白合成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 DNA 的转录和翻译在细胞外的环境中有效的结合起来。GZL Bioscience 开发的无细胞重组蛋白合成系统利用了细菌细胞提取物来完成上述过程。该细胞提取物含有 DNA 转录和翻译所需要的所有“元件”，包括核糖体，蛋白翻译因子，氨酰 tRNA 合成酶，总 tRNA 和蛋白质合成所需的其它组分。在一个标准的 GZL 透析式无细胞重组蛋白合成反应中，用户需要将模板 DNA，细胞提取液和其他必须的组分混合在一起放入透析袋内，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袋内的小分子进行交换，促进和提高蛋白质产量。而 GZL 非透析式无细胞重组蛋白合成系统则不需透析系统，可直接将模板 DNA 与蛋白表达所需大分子及小分子混合。该系统更便于快速操作，但蛋白质产量小于上面所述的透析系统。下图解释了一个透析式细胞外蛋白合成反应的基本设置（Figure 1）。

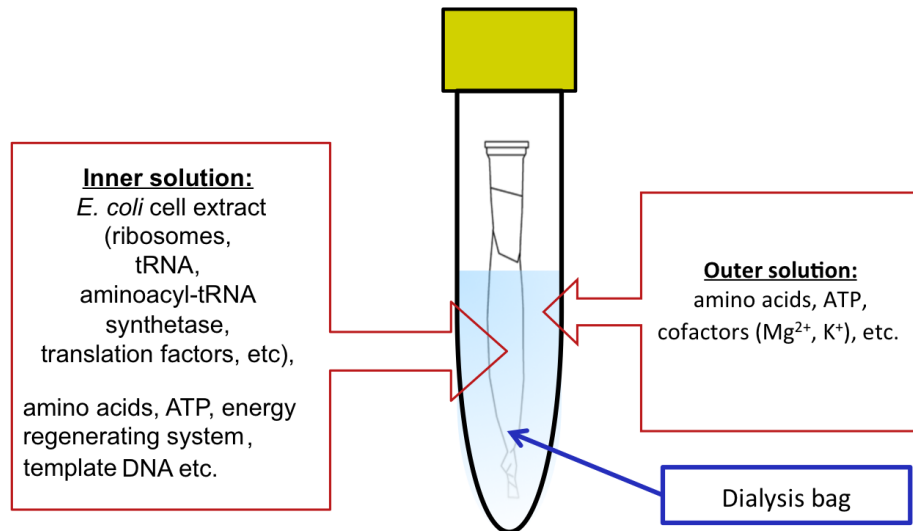


Figure 1: 透析式无细胞重组蛋白合成反应示意图

无细胞重组蛋白合成系统有着诸多的应用。(1) 客户可以利用在反应中添加表面活性剂或其他添加剂的方法来提高膜蛋白的表达量和活性。(2) 可以将昂贵的同位素标记蛋白和非天然氨基酸标记蛋白的表达成本降低到可以让普通实验室接受的程度。(3) 客户可以有效的表达细胞内系统无法表达的毒性蛋白。(4) 可以实现高通量蛋白质合成。该高通量系统可以与质谱，核磁共振，蛋白结晶，生化反应等下游分析手段结合，不仅可以缩短实验时间，还将让您在较短的时间内得到更多的实验数据。由于其无可比拟的优势，不同领域的研究人员已经在用它合成抗体药物，同位素标记蛋白质和非天然氨基酸标记蛋白质，并不断发表高质量的科学论著。

GZL 大肠杆菌无细胞重组蛋白合成试剂盒产品目录、DNA 模板制备，试剂盒组分及用户需准备材料

试剂盒产品目录：

| 品名 | Cat.No. | 介绍 |
|------------------------|-------------|---------------------------------|
| 非透析式大肠杆菌无细胞重组蛋白合成试剂盒 | CF-EC-2500 | 该试剂盒可提供共 2.5 mL 或 50 × 50 uL 反应 |
| 透析式大肠杆菌无细胞重组蛋白合成试剂盒 | CF-EC-1000D | 该试剂盒可提供共 1 mL 或 5 × 200 uL 反应. |
| 高通量透析式大肠杆菌无细胞重组蛋白合成试剂盒 | CF-EC-8000D | 该试剂盒(含高通量透析装置)可提供共 8 × 1 mL 反应 |

DNA 模板制备：

用于此无细胞重组蛋白合成反应中的 DNA 模板可以是 PCR 产物，线性 DNA 或 DNA 质粒。该 DNA 模板 (**Figure 2**) 需要包含一个 T7 启动子(T7 promoter)，核糖体结合位点 (RBS;位于 ATG 起始密码子上游 7-11 核酸的位置)，ATG 起始密码子(ATG start codon)，终止密码子(stop codon)和一个 T7 终止子(T7 terminator)。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)，以便蛋白合成后的纯化。由于 DNA 模板的纯度是决定无细胞蛋白合成反应好坏的重要因素之一。该 DNA 模板不能含有 DNA 酶 (DNases) 和 RNA 酶 (RNases)。

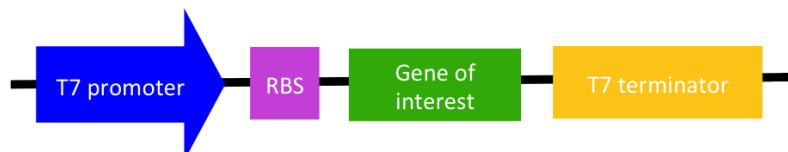


Figure 2: 用于无细胞重组蛋白合成的 DNA 模板的示意图。

下图中展示了用 DNA 质粒为模板的无细胞重组蛋白合成的蛋白的凝胶分析和核磁共振机构分析 (**Figure 3**)

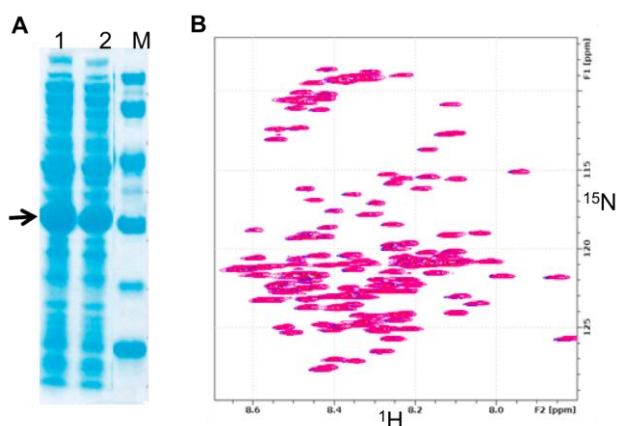


Figure 3: **A:** SDS-PAGE (10%) 对合成后的目标蛋白的分析：1 中为未离心过的无细胞反应样品；2 中为离心后的上清液样品；M 中为 LMW 蛋白标准样；箭头所示为过量表达的人碳酸酐酶；该图说明合成的目标蛋白绝大多数为可溶蛋白。**B:** ¹⁵N 标记的人碳酸酐酶的 ¹⁵N-HSQC 核磁共振谱图。

试剂盒组分:

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合成效果, 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。

| | |
|----------------------|-------------------|
| 非透析式大肠杆菌无细胞重组蛋白合成试剂盒 | Cat. # CF-EC-2500 |
|----------------------|-------------------|

每个试剂盒可提供 2.5 mL 或 50 × 50 uL 反应.

- 260 uL 大肠杆菌破碎液 (*E. coli* cell extract) ①
- 340 uL 反应预混液 (Reaction mix) ②
- 8 uL 对照 DNA 模板 (Control template DNA; 400 ng/uL) ④
- 300 uL 稀释用缓冲液 (Dilution buffer) ⑤

| | |
|---------------------|--------------------|
| 透析式大肠杆菌无细胞重组蛋白合成试剂盒 | Cat. # CF-EC-1000D |
|---------------------|--------------------|

每个试剂盒可提供 1 mL 或 5 × 200 uL 反应.

- 120 uL 大肠杆菌破碎液 (*E. coli* cell extract) ①
- 347.69 uL 反应预混液 (Reaction mix) ②
- 5 mL 透析外液 (Outer mix) ③
- 8 uL 对照 DNA 模板 (Control template DNA; 400 ng/uL) ④
- 500 uL 稀释用缓冲液 (Dilution buffer) ⑤
- 5 × 透析袋及盖子 (Dialysis tubes and lids)

| | |
|------------------------|--------------------|
| 高通量透析式大肠杆菌无细胞重组蛋白合成试剂盒 | Cat. # CF-EC-8000D |
|------------------------|--------------------|

每个试剂盒可提供 8 × 1 mL 反应.

- 0.96 mL 大肠杆菌破碎液 (*E. coli* cell extract) ①
- 2.782 mL 反应预混液 (Reaction mix) ②
- 40 mL 透析外液 (Outer mix) ③
- 8 uL 对照 DNA 模板 (Control template DNA; 400 ng/uL) ④
- 4 mL 稀释用缓冲液 (Dilution buffer) ⑤
- 1 × 高通量透析装置(High-throughput dialysis system)

用户需准备材料:

- 包含目标蛋白 DNA 序列的模板 DNA(建议采用 **Maxiprep DNA** 质粒, 不建议采用 **Miniprep** 样品)
- 去 DNA 酶与 RNA 酶的 0.5 mL 离心管、1.5 mL 离心管、10 mL 或 15 mL 尖底离心管
- 纯水 (去核酸酶)
- 30°C 水浴摇床或温控摇床
- 台式小型离心机 (建议 4°C 操作)
- SDS-PAGE 凝胶电泳槽
- 蛋白纯化装置和耗材, 包括 Ni-NTA 柱, GSTrap 柱, 等。

非透析式大肠杆菌无细胞重组蛋白合成试剂盒(#CF-EC-2500)的操作步骤

建立 50 × 50 uL 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:
 - ❖ 按以下描述将各反应组件于 50 × 0.5 mL 离心管或 PCR 管(未包含在该试剂盒内)内混合:

| 组件 | 用户反应(×48) | 阴性对照反应 | 阳性对照反应 |
|--|-----------------|--------|----------|
| 反应预混液 (Reaction mix) ② | 17 uL | 17 uL | 17 uL |
| 模板 DNA | 20 ng/uL 质粒 DNA | 0 | 2.5 uL ④ |
| 大肠杆菌破碎液 (<i>E. coli</i> cell extract) ① | 13 uL | 13 uL | 13 uL |
| 加稀释用缓冲液 (Dilution buffer) ⑤ 直至 | 50 uL | 50 uL | 50 uL |

3. 将混合液混匀后离心 5 秒钟左右, 使管壁上的混合液流入离心管的底部;
4. 立即将离心管置于温控摇床, 在 30°C 下轻摇 2 小时;
5. 将离心管取出并置于离心机内, ≥ 14 000 g 下 4°C 低温离心 10 分钟;
 - *如不需离心, 请跳至第 7 步;
6. 将上清液移至新的离心管或 PCR 管内;
7. 取 3–5 uL 反应样品, 并用 SDS-PAGE 凝胶电泳检查目标蛋白是否表达。

建立 1 mL 反应:

*建议用户在建立 1 mL 反应之前, 先做 50 uL 小规模及对照反应检查目的蛋白是否表达。

按一下描述混合各组件, 并遵循上述 1–7 步建立反应。

- ❖ 按以下描述将各反应组件于 1.5 mL 离心管(未包含在该试剂盒内)内混合:

| 组件 | 用户反应 |
|--|-----------------|
| 反应预混液 (Reaction mix) ② | 340 uL |
| 模板 DNA | 20 ng/uL 质粒 DNA |
| 大肠杆菌破碎液 (<i>E. coli</i> cell extract) ① | 260 uL |
| 加稀释用缓冲液 (Dilution buffer) ⑤ 直至 | 1 mL |

注意:

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 Miniprep 样品。
3. 建议做 50 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。

透析式大肠杆菌无细胞重组蛋白合成试剂盒(#CF-EC-1000D)操作步骤

建立 5 × 200 uL 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于 1.5 mL 离心管(未包含在该试剂盒内)内混合:

| 组件 | 用户反应 | 阴性对照反应 | 阳性对照反应 |
|--|--------------------|----------|----------|
| 反应预混液 (Reaction mix) ② | 69.54 uL | 69.54 uL | 69.54 uL |
| 模板 DNA | 16 ng/uL 质粒 DNA | 0 | 8 uL ④ |
| 大肠杆菌破碎液 (<i>E. coli</i> cell extract) ① | 24 uL | 24 uL | 24 uL |
| 加稀释用缓冲液 (Dilution buffer) ⑤直至 | 200 uL | 200 uL | 200 uL |

- ❖ 反应外液: 按以下描述将反应组件于 10 mL 尖底离心管(未包含在该试剂盒内)内混合:

| 组件 | 用户反应 | 阴性对照反应 | 阳性对照反应 |
|--------------------|------|--------|--------|
| 透析外液 (Outer mix) ③ | 1 mL | 1 mL | 1 mL |
| 加去核酸酶纯水直至 | 2 mL | 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底部;
4. 转移反应内液至提供的透析袋内, 并改上盖子;
5. 将该透析袋置于盛有反应外液的 10 mL 尖底离心管内, 并确认反应外液平面高于反应内液平面; 盖上盖子;
6. 立即将 10 mL 离心管竖直置于 30°C 水浴 (180–200 rpm) 中过夜 (或 6 小时) 培养;
7. 将透析袋内的反应液转移至干净的离心管内, 并离心 ($\geq 14\ 000\ g$, 4°C, 10 分钟);
8. 将上清液转移至干净的离心管内。用户可选择直接用其进行下游分析, 或低温保存;
9. 取 3–5 uL 反应样品, 并用 SDS-PAGE 凝胶电泳检查目标蛋白是否表达。

注意:

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 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。

建立 1 mL 反应:

*建议用户在建立 1 mL 反应之前, 先使用上述 200 uL 反应对目的蛋白的表达情况和产量进行估测。

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于 1.5 mL 离心管(未包含在该试剂盒内)内混合:

| 组件 | 用户反应 |
|--|-----------------|
| 反应预混液 (Reaction mix) ② | 347.7 uL |
| 模板 DNA | 16 ng/uL 质粒 DNA |
| 大肠杆菌破碎液 (<i>E. coli</i> cell extract) ① | 120 uL |
| 加稀释用缓冲液 (Dilution buffer) ⑤直至 | 1 mL |

- ❖ 反应外液: 按以下描述将反应组件于 15 mL 尖底离心管(未包含在该试剂盒内)内混合:

| 组件 | 用户反应 |
|------------------------|-------|
| 透析外液 (Outer mixture) ③ | 5 mL |
| 加去核酸酶纯水直至 | 10 mL |

- 5 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底部;
- 6 转移反应内液至提供的透析袋内, 并改上盖子;
- 7 将该透析袋置于盛有反应外液的 15 mL 尖底离心管内, 并确认反应外液平面高于反应内液平面; 盖上盖子;
- 8 立即将 15 mL 离心管竖直置于 30°C 水浴 (180–200 rpm) 中过夜 (或 6 小时) 培养;
- 9 将透析袋内的反应液转移至干净的离心管内, 并离心 ($\geq 14\ 000\ g$, 4°C, 10 分钟);
- 10 将上清液转移至干净的离心管内。用户可选择直接用其进行下游分析, 或低温保存;
- 11 取 3–5 uL 反应样品, 并用 SDS-PAGE 凝胶电泳检查目标蛋白是否表达。

注意:

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 Miniprep 样品。**
3. 建议先做 200 uL 反应, 用其跟阴性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。

高通量透析式大肠杆菌无细胞重组蛋白合成试剂盒(#CF-EC-8000D)的操作步骤:

建立 8 × 1 mL 反应:

*建议用户在建立该反应之前,先使用上述 200 uL 反应对目的蛋白的表达情况和产量进行估测

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于 8 × 1.5 mL 离心管(未包含在该试剂盒内)内混合:

| 组件 | 用户反应 |
|--|------------------|
| 反应预混液 (Reaction mix) ② | 347.7 uL |
| 模板 DNA | 16 ng/uL Plasmid |
| 大肠杆菌破碎液 (<i>E. coli</i> cell extract) ① | 120 uL |
| 加稀释用缓冲液 (Dilution buffer) ⑤ 直至 | 1 mL |

- ❖ 反应外液:按以下描述将反应组件于提供的外液容器中:

| 组件 | 用户反应 |
|--------------------|-------|
| 透析外液 (Outer mix) ③ | 40 mL |
| 加去核酸酶纯水直至 | 80 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底部;
4. 转移反应内液至提供的高通量透析袋内,并改上盖子;
5. 将该透析装置置于盛有反应外液的外液容器内,并确认反应外液平面高于反应内液平面;
6. 立即将该容器竖直置于 30°C 水浴 (<150 rpm; 摇晃不得致使外液接触透析袋最高处)中过夜(或 6 小时)培养;
7. 将透析袋内的反应液转移至干净的离心管内,并离心 ($\geq 14\ 000\ g$, 4°C, 10 分钟);
8. 将上清液转移至干净的离心管内。用户可选择直接用其进行下游分析,或低温保存;
9. 取 3–5 uL 反应样品,并用 SDS-PAGE 凝胶电泳检查目标蛋白是否表达。

注意:

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 Miniprep 样品。**
3. 建议先做 200 uL 反应,用其跟阴性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。