

Code No. 3281

研究用

TaKaRa

Human Cell-Free Protein
Expression System

说明书

目 录

内 容	页码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 试剂盒外所需材料	1
● 保 存	1
● 操作方法	1
● Control 实验（合成 β -半乳糖苷酶）	3
● 实验例	4
● Troubleshooting	5
● 关联产品	6

● 制品说明

Human Cell-Free Protein Expression System 是利用人源细胞提取物的无细胞蛋白质合成系统。本系统中的 Cell Lysate 包含了所有体外蛋白质合成的必需因子（核糖体、翻译起始/延伸因子和 tRNA 等）。只需将携带靶基因的 pT7-IRES Vector、T7 RNA Polymerase、Mixture-3（氨基酸和 ATP 等）和 Mixture-2（翻译增强因子）加入到 Cell Lysate 中，就可以在一个反应管中完成从 RNA 转录到蛋白质合成的反应，操作十分简单。本制品具有反应体系小、反应速度快、可合成无细胞蛋白质的优点。

使用 pT7-IRES Vector 转录得到的靶基因转录本含有 IRES 序列，这段序列能够促进蛋白质翻译的起始过程。反应液中添加了解释增强因子，在蛋白质合成过程中，它能够活化 Cell Lysate 中无活性的翻译起始因子，从而维持了稳定的翻译水平。本系统不仅提高了蛋白质合成的效率，弥补了哺乳类无细胞蛋白质合成系统翻译水平低的缺陷，而且能够合成超过 150 kDa 的高分子量蛋白质。

本系统适用于高通量的蛋白质合成反应，只需一步即可完成。由于毒性反应会抑制宿主细胞生长和功能，导致很难利用活细胞表达系统来合成毒性蛋白质，所以本系统尤其适用于合成毒性蛋白质。

● 制品内容 (20 μ l 反应 $\times$ 10 次)

(1) Cell Lysate ^{*1}	100 μ l
(2) Mixture-1	60 μ l
(3) Mixture-2 ^{*2}	10 μ l
(4) Mixture-3 ^{*2}	20 μ l
(5) T7 RNA Polymerase (200 U/ μ l)	10 μ l
(6) pT7-IRES Vector (0.5 μ g/ μ l)	20 μ l
(7) Control Vector ^{*3} (0.3 μ g/ μ l)	5 μ l

^{*1} 现用现融解，使用微量移液器轻轻混合均匀并迅速使用，使用完毕立即置于-80℃保存。

注：虽然 5 次反复冻融基本不会造成产品性能下降，但建议小量分装保存。

^{*2} Mixture-2 和 Mixture-3 中均含有蛋白质，其中 Mixture-2 中含有 HN 标签蛋白质，因此应避免剧烈搅拌或振荡。

^{*3} 该质粒在 pT7-IRES 中插入了 β -半乳糖苷酶基因。

● 试剂盒外所需材料

1. 试剂

- 蛋白质凝胶染色试剂（如 CBB 染色）
- 脱色试剂

2. 器具

- SDS-PAGE 电泳装置
- 各种 tube
- 热循环仪或恒温槽（32℃保温用）
- 空气浴或恒温槽（37℃保温用）

● 保存：-80℃

● 操作方法

1-构建表达质粒

将含有目的基因的 DNA 片段插入到 pT7-IRES Vector 多克隆位点 (MCS) 中来构建表达质粒。采用 PCR 扩增、酶切含有目的基因的质粒、人工合成基因等方法来获取所需的 DNA 片段。另外，DNA 片段无需添加 polyA 序列。

建议将 *Nco* I 酶切位点作为目的基因插入 pT7-IRES 质粒多克隆位点的插入位点，因为 *Nco* I 酶切位点的

5' 末端序列为 ATG, 可以直接作为蛋白质合成的起始密码子。如果目的基因片段插入到除 *Nco* I 以外的位点(*Bam*H I-*Xba* I)时, 请以上游的 *Nco* I 位点中的 ATG 序列作为目的基因读码框的起始密码子。

以下是采用 In-Fusion 方法构建表达载体的实验例。In-Fusion 方法是无需限制酶酶切, 即可简便地定向克隆的技术。在下面的实验例中, *Nco* I 位点中的 ATG 作为目的蛋白质的起始密码子。

<In-Fusion 方法构建表达质粒的实验例 (目的片段克隆在 *Nco* I/*Xba* I 位点间) >

1. Primer 设计

N 末端 primer:

按以下 5' 末端含有起始密码子(ATG)的 15 个碱基开始设计引物。

5' -ATggCCACAACCATg-ORF 的 N 端编码序列-3'

C 末端 primer:

按以下 5' 末端的 18 个碱基开始设计引物, 其中包含了终止密码子(TCA) (无需添加 polyA 序列)

5' -gTTATgCTAgTCTAgTCA-ORF 的 C 端编码序列-3'

2. DNA 片段制备与 In-Fusion 克隆

- 使用步骤 1.中设计的引物和 PrimeSTAR Max DNA Polymerase 或者 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 等高保真酶进行 PCR 扩增来获得目的片段 DNA;
- 将 *Nco* I 和 *Xba* I 消化后的线性化 pT7-IRES Vector 与目的片段 DNA 加入到 In-Fusion 反应液中, 即目的基因克隆到载体中;
- 选择高转化效率的 *E. coli* HST08 Premium Competent Cells 等 *E. coli* 感受态细胞进行转化, 筛选阳性克隆;
- 如果有必要, 通过测序来验证目的片段 DNA 的序列。

※关于 In-Fusion 方法的操作步骤及引物设计方法, 请参考 In-Fusion 产品的说明书。

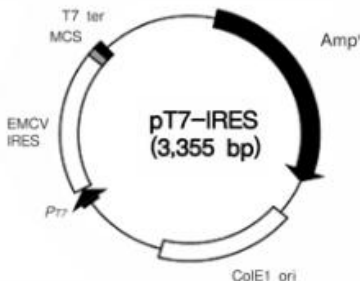


图 1. pT7-IRES Vector 图谱

EMCVIRE		<i>Nco</i> I		<i>Bam</i> H I		<i>Eco</i> R I		(Nde I) *		<i>Bgl</i> II		<i>Nhe</i> I	
5'	<u>-TAATATGGCCACAACC</u>		ATG	GGA	TCC	GAA	TTC	CAT	ATG	AGA	TCT	GCT	AGC
3'	<u>-ATTATACCGGTGTTGG</u>		TAC	CCT	AGG	CTT	AAG	GTA	TAC	TCT	AGA	CGA	TCG
			Met	Gly	Ser	Glu	Phe	His	Met	Arg	Ser	Ser	Ala
<i>Sal</i> I													
<i>Hinc</i> II		<i>Eco</i> R V		<i>Xho</i> I		<i>Xba</i> I		T7 Terminator					
<u>GTC GAC GAT ATC</u>		<u>CTC GAG TCT AGA</u>		<u>CTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAA</u>		-3'							
<u>CAG CTG CTA TAG</u>		<u>GAG CTC AGA TCT</u>		<u>GATCGTATTGGGGAACCCCGGAGATTT</u>		-5'							

图 2. pT7-IRES Vector 多克隆位点 (MCS) 碱基序列

* 不能使用 *Nde* I 酶切位点。

* EMCV = Encephalomyocarditis virus (脑心肌炎病毒)

2-操作步骤

1) 以下试剂在冰上完全溶解后混匀，分取至反应管中，使用移液枪轻轻吸打混合均匀反应液。

Cell Lysate	9 μ l
Mixture-1	6 μ l
Mixture-2	1 μ l

2) 室温静置 10 分钟。

3) 以下试剂在冰上完全溶解后混匀，添加至上述反应管中。全部试剂添加后，使用移液枪轻轻吸打混合均匀反应液。

※反应液粘度较高，请使用移液枪轻轻吸打 10~20 次，混合不均匀会导致表达量有所下降。

Mixture-3	2 μ l
Plasmid*1 (0.3 μ g/ μ l)	1 μ l
T7 RNA Polymerase	1 μ l

4) 32°C 反应 1~6 小时*2。

*1: 请参考「构建表达质粒」构建含有目的序列的质粒。

*2: 最适反应时间因蛋白质的不同而有所不同。通常推荐反应时间为 3 小时，延长反应时间至 6 小时也可以。合成的蛋白质可以通过 SDS-PAGE 或者 Western blot 检出。请参考「实验例 1~3」。

3-操作注意事项

1) 除 Plasmid 与 Mixture-1 外，其它试剂只在使用前冰上融解，使用后迅速于-80°C 保存。

2) 建议 Cell Lysate 小量分装保存。

3) 添加 Mixture-3 时，有可能会产生不溶物，但不影响产品性能。

● Control 实验（合成 β -半乳糖苷酶）

根据操作步骤进行操作。步骤 3) 中 Control Vector 使用 1 μ l，步骤 4) 反应时间设定为 3 小时。反应后按下述方法检测合成的 β -半乳糖苷酶。

显色实验（检出 β -半乳糖苷酶）

1. 按以下比例配制反应液，使用移液枪轻轻吸打充分混合均匀。

上述 Control 反应液	1 μ l
X-Gal solution (25 mg/ml) *	1 μ l
灭菌水	18 μ l

*: 配制时溶于二甲基亚砜。

2. 37°C 温浴 30~60 分钟。

合成 β -半乳糖苷酶后，如图 3 所示，检测结果显蓝色。



30 分钟后显色

Tube1: Negative control (无色)

Tube2: + Control Vector (蓝色)

图 3 显色实验（检出 β -半乳糖苷酶）结果

β -半乳糖苷酶的实时表达及翻译增强因子 (Mixture-2) 的添加效果

[方法]

准备 8 个反应管，每个反应中添加 1 μ l Control Vector，按操作方法合成 β -半乳糖苷酶。反应开始后，分别在 0、0.5、1、2、3、4.5、6、8 小时取出反应管，以 ONPG (o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside) 为基质检出 β -半乳糖苷酶。同时与未添加翻译增强因子的反应管做以比较。

[结果]

添加翻译增强因子 (Mixture-2) 后，蛋白质合成量明显增加。

β -半乳糖苷酶表达量随着反应时间的增加而增加。反应直至大约 8 小时，维持稳定表达。

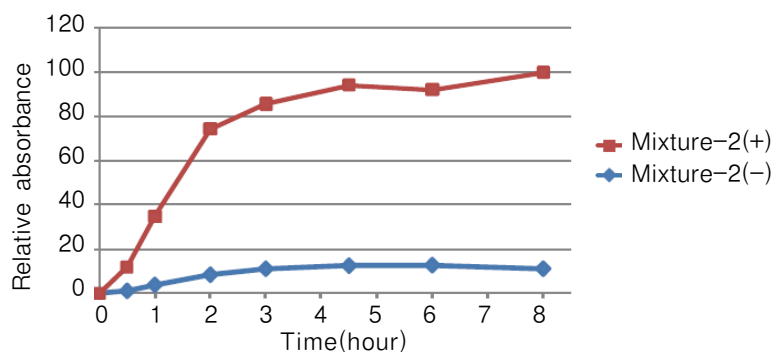


图 4. β -半乳糖苷酶合成量结果

● 实验例

实验例 1: 使用本制品表达高分子量蛋白质 (170 kDa, 200 kDa)

[方法]

按照操作方法合成蛋白质。进行 SDS-PAGE、CBB 染色，检出目的蛋白质。

[结果]

CBB 染色可以成功检出目的蛋白质 (170 kDa, 200 kDa)。

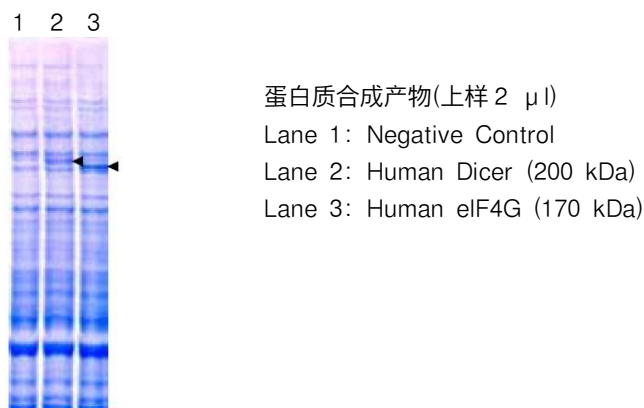


图 5. SDS-PAGE 结果

实验例 2: 翻译增强因子 (Mixture-2) 添加效果

[方法]

添加翻译增强因子 (通常的操作方法) 与不添加进行合成蛋白质反应比较。进行 SDS-PAGE、CBB 染色，检出目的蛋白质。

[结果]

添加翻译增强因子的反应结果显示，蛋白质合成量增加。

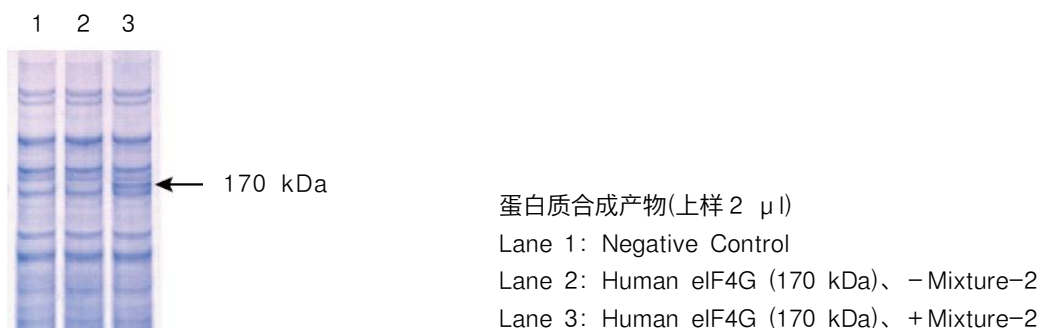


图 6. SDS-PAGE 结果

实验例 3: 使用本制品合成带有标签序列的目的蛋白质 (Western blot 分析)

[方法]

按照操作方法合成蛋白质。使用 SDS-PAGE、Western blot 方法检出目的蛋白质。检出时使用了「DYKDDDDK」标签的识别抗体。

[结果]

Western blot 检出目的蛋白质 (80 kDa, 200 kDa)。

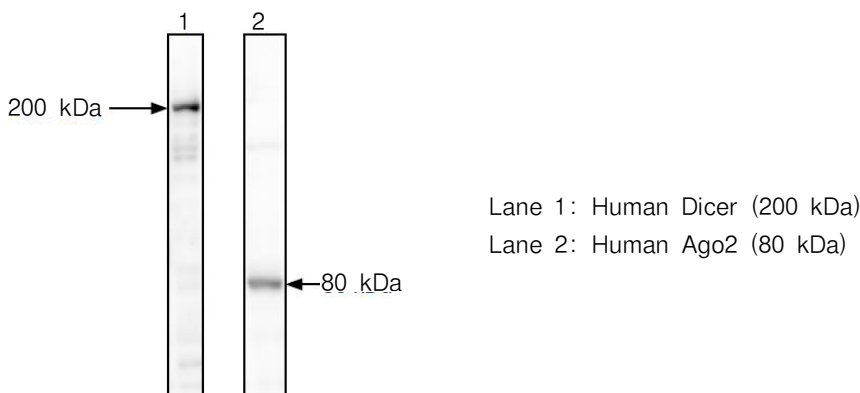


图 7. Western blot 结果

● Troubleshooting

1. 没有合成目的蛋白质

目的蛋白质的合成与目的基因的来源、序列、RNA 和蛋白质的稳定性有很大关系。除此之外，操作过程中引起合成量低下主要有以下几方面原因。

- 反应液混合不均匀。
 - Cell Lysate 粘性较大，反应液配制时要轻柔且充分混合均匀。
- 制备的质粒含有高浓度的核酸酶。
 - 进行苯酚/氯仿抽提，乙醇沉淀。乙醇清洗要充分，注意不能残留苯酚。
- 质粒纯度低。
 - 进行苯酚/氯仿抽提，乙醇沉淀。乙醇清洗要充分，注意不能残留苯酚。
- 质粒浓度低。
 - 乙醇沉淀进行浓缩。
- 试剂保存不当。
 - 请保存于适当的温度。

2. Control 反应中蓝色显色较弱。
 - a. 反应液混合不均匀。
→ Cell Lysate 粘性较大，反应液配制时要轻柔且充分混合均匀。
 - b. 试剂保存不当。
→ 请保存于适当的温度。

● 关联产品

Human Cell-Free Protein Expression Maxi System (Code No. 3285)
pT7-IRES His-N DNA (Code No. 3290)
pT7-IRES His-C DNA (Code No. 3291)
pT7-IRES Myc-N DNA (Code No. 3292)
In-Fusion[®] HD Cloning Plus (Code No. 638909/638910/638911/638920)
In-Fusion[®] HD Cloning Plus CE (Code No. 638916/638917/638918/638919)
PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase (Code No. R045A/B)
PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase (Code No. R010A/B)
PrimeSTAR[®] HS (Premix) (Code No. R040A)
DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (Code No. 6023)
TaKaRa DNA Ligation Kit LONG (Code No. 6024)
Protein Molecular Weight Marker (Low) (Code No. 3450)
Protein Molecular Weight Marker (High) (Code No. 3451)
Protein Molecular Weight Marker (Broad) (Code No. 3452)
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside) (Code No. 9031)

PrimeSTAR is a registered trademark of Takara Bio Inc.

In-Fusion is a registered trademark of Takara Bio USA, Inc.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takarabio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考Takara Bio Inc.网站。为正确使用Takara产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>