

Cell Free Protein Expression

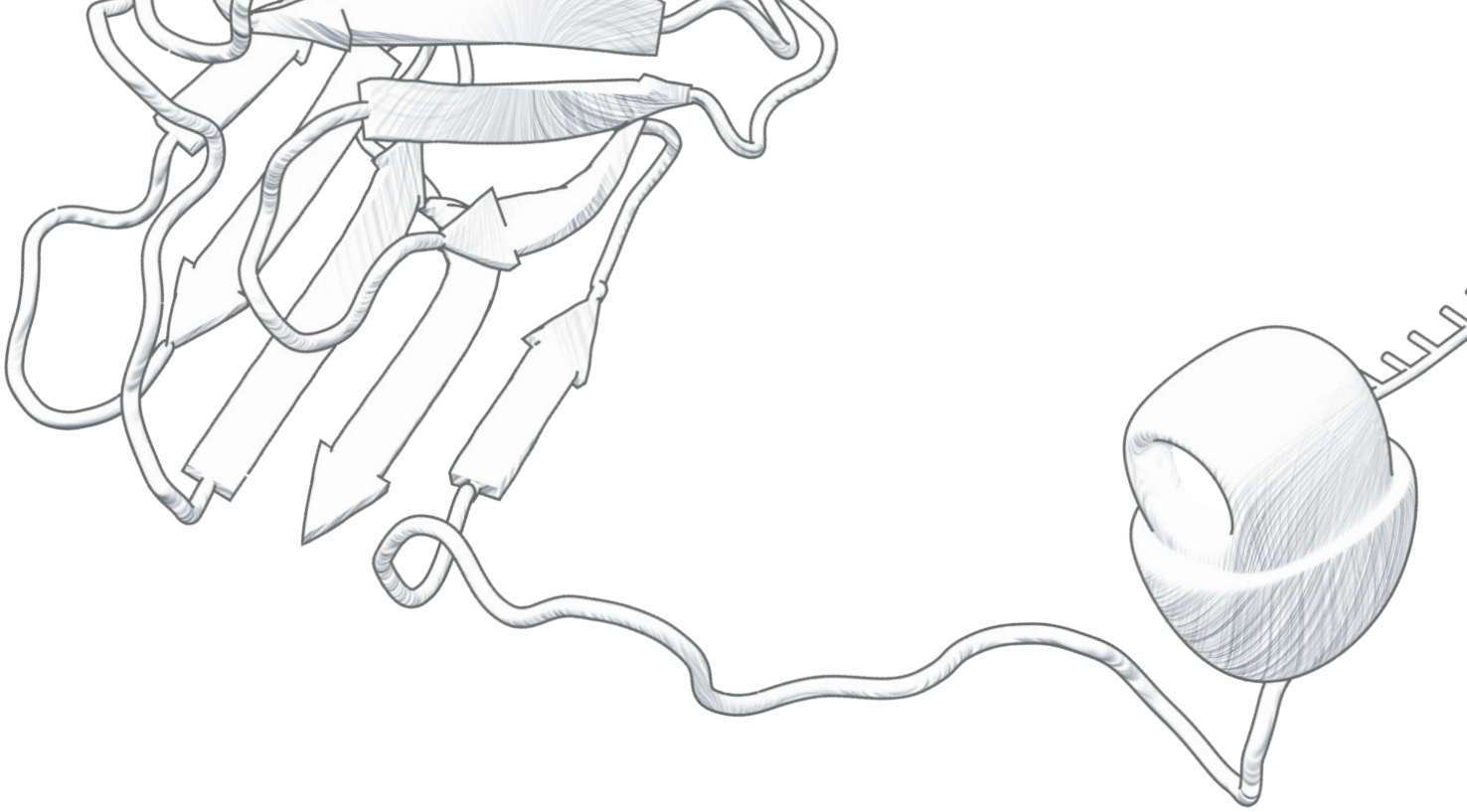
无细胞蛋白表达技术

短至 1 小时内获得功能性蛋白

Content

目录

1. 无细胞蛋白合成	3
• 无细胞蛋白合成的应用	4
• 无细胞表达系统的起源	5
• 无细胞蛋白表达的选择	6
2. 基于 mRNA 的翻译系统	8
兔网织红细胞裂解系统	10
• Rabbit Reticulocyte Lysate System, Nuclease-Treated	10
• Flexi [®] Rabbit Reticulocyte Lysate System	11
小麦胚提取物系统	12
• Wheat Germ Extract	12
3. 基于 DNA 的转录和翻译系统	14
兔网织红细胞裂解物系统	17
• TNT [®] SP6 Coupled Reticulocyte Lysate System	18
• TNT [®] T7 Coupled Reticulocyte Lysate System	18
• TNT [®] T3 Coupled Reticulocyte Lysate System	18
• TNT [®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation System	18
• TNT [®] SP6 Quick Coupled Transcription/Translation System	18
• TNT [®] T7 Quick for PCR DNA	18
TNT[®] 偶联麦胚提取物系统	19
• TNT [®] Coupled Wheat Germ Extract System	19
• TNT [®] SP6 High-Yield Wheat Germ Protein Expression System	20
TNT[®] T7 昆虫细胞提取物蛋白表达系统	21
• TNT [®] T7 Insect Cell Extract Protein Expression System	21
大肠杆菌提取物系统 <i>E. coli</i> Extracts	22
• <i>E. coli</i> S30 Extract System for Linear Templates	22
• <i>E. coli</i> S30 Extract System for Circular DNA	23
• <i>E. coli</i> T7 S30 Extract System for Circular DNA	23
• S30 T7 High-Yield Protein Expression System	24
4. 无细胞蛋白标记试剂	25
• FluoroTect [™] Green _{Lys} in vitro Translation Labeling System	27
• Transcend [™] Non-Radioactive Translation Detection Systems	28



无细胞蛋白合成

Cell-Free Protein Synthesis

无细胞蛋白质合成是分子生物学家在基础和应用科学中的重要工具。它与活细胞中的蛋白质表达相比具有显著优势，越来越多地被用于高通量功能基因组学和蛋白质组学。更多无细胞蛋白合成的应用请参见表 1。无细胞蛋白质合成对于产生蛋白质阵列（如核酸可编程蛋白质阵列（NAPPA）和使用显示技术的酶工程）至关重要。无细胞方法提供了将表型（表达蛋白的功能）与基因型相关的最快方法。蛋白质合成可以在几个小时内使用 mRNA 模板在翻译系统中或 DNA 模板（质粒 DNA 或 PCR 片段）在偶联的转录和翻译系统中进行。此外，无细胞蛋白表达系统对于表达有毒蛋白、膜蛋白、病毒蛋白以及通过细胞内蛋白酶进行快速蛋白水解降解的蛋白是不可或缺的。

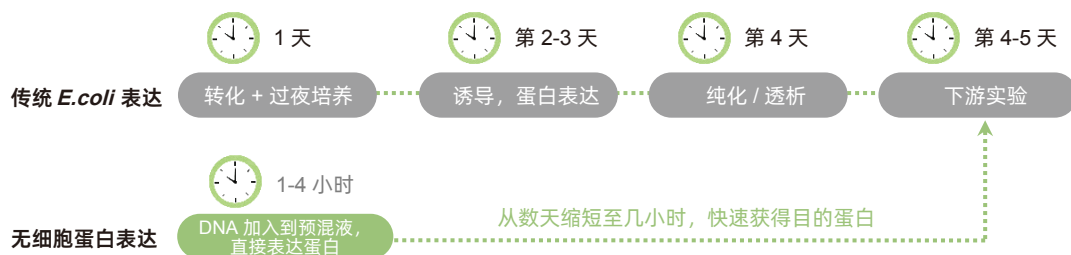


表 1. 无细胞蛋白合成的应用

功能基因组 / 蛋白质组分析

- 基因突变 / 缺失分析 (如酶动力学)
- 蛋白质结构域映射
- 蛋白质相互作用的表征
- 凝胶迁移 EMSA
- 蛋白质芯片制备

难表达蛋白的表达

- 细胞毒性蛋白、膜蛋白、病毒蛋白、激酶

蛋白质进化 / 酶工程

- 展示技术 (如核糖体、mRNA 展示、体外分区)
- 通过核糖体展示体外抗体的进化

转录 / 翻译调控分析

- RNA 结构分析, 如翻译调控元件的表征 (如 UTR、帽结构、IRES)
- RNA 病毒表征

筛选

- 筛选化学库
- 药物筛选 (如抗生素)

蛋白质标记

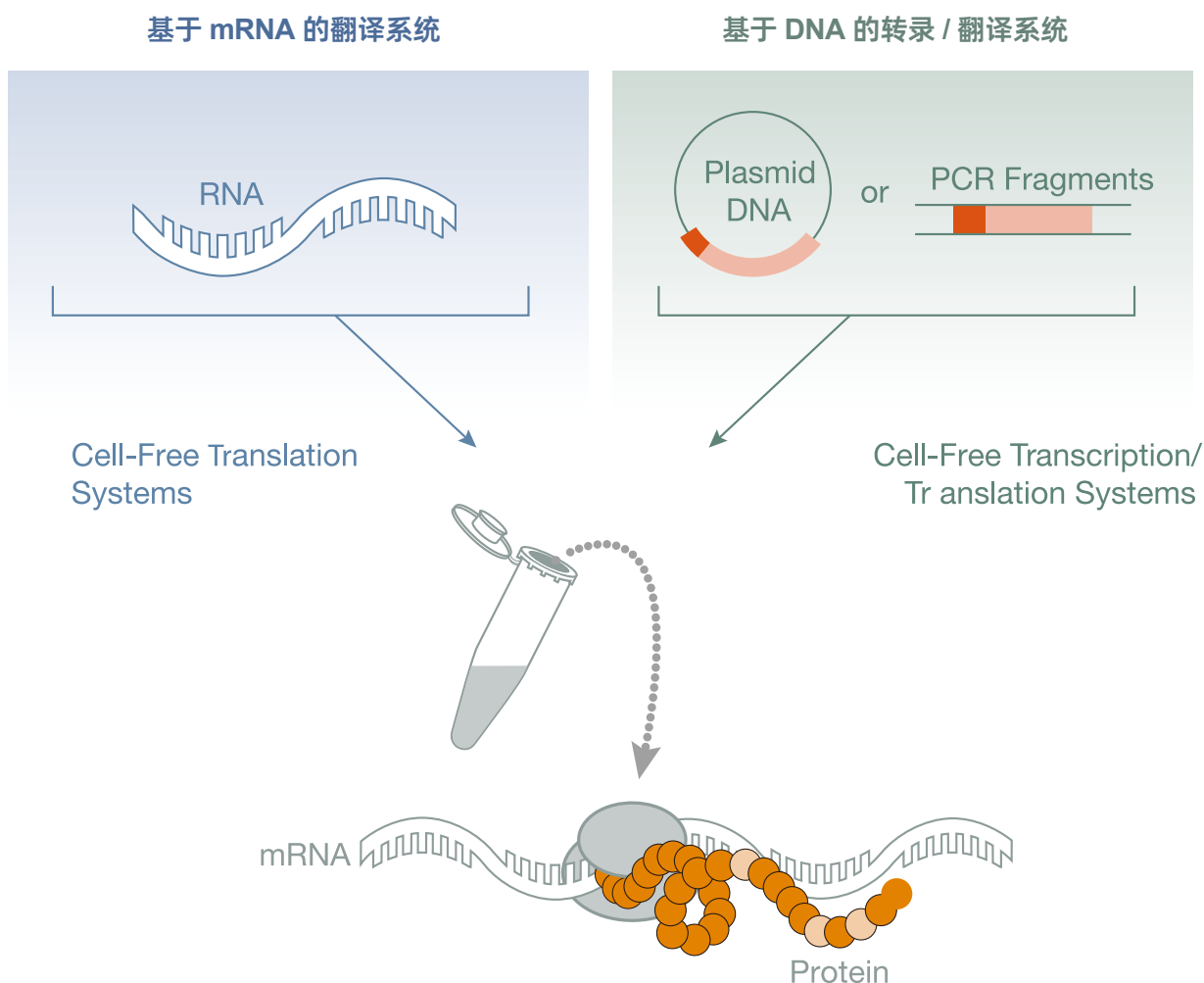
- 开放系统允许掺入标记的氨基酸

无细胞表达系统的起源

Origins of Cell-Free Expression Systems

无细胞蛋白表达裂解物由参与高蛋白合成率的细胞产生，例如未成熟红细胞（网织红细胞）。最常用的无细胞表达系统来源于兔网织红细胞、小麦胚芽和大肠杆菌。有两种类型的无细胞表达系统：翻译系统和转录翻译偶联（TNT[®]）系统（见下图 1）。这两种系统都提供翻译所需的大分子成分，如核糖体、tRNA、氨基酰-tRNA 合成酶、起始、延伸和终止因子。为了确保高效翻译，每个提取物必须补充氨基酸、能量源（ATP、GTP）、能量再生系统和盐（Mg²⁺、K⁺ 等）。对于真核系统，磷酸肌酸和磷酸肌酸激酶作为能量再生系统，而原核系统补充磷酸烯醇丙酮酸和丙酮酸激酶。用噬菌体衍生的 RNA 聚合酶（T7、T3 或 SP6）补充偶联的转录和翻译系统，可以进行 T7、T3 或 SP6 启动子下游克隆的基因表达。

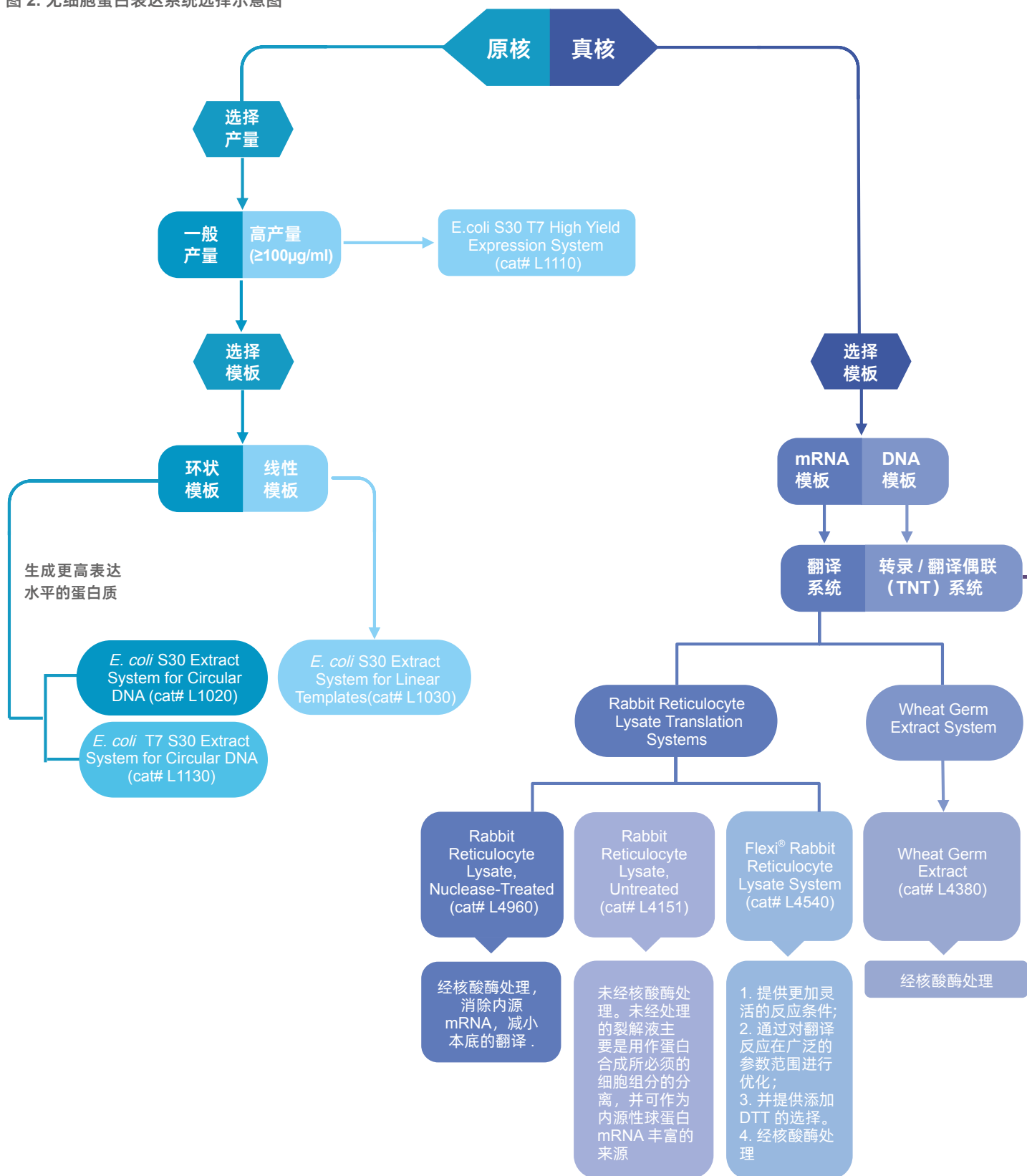
图 1. 无细胞蛋白质表达系统分为基于 mRNA 的翻译系统和基于 DNA 的转录 / 翻译系统。



无细胞蛋白表达的选择

Selection of Cell-Free Protein Expression

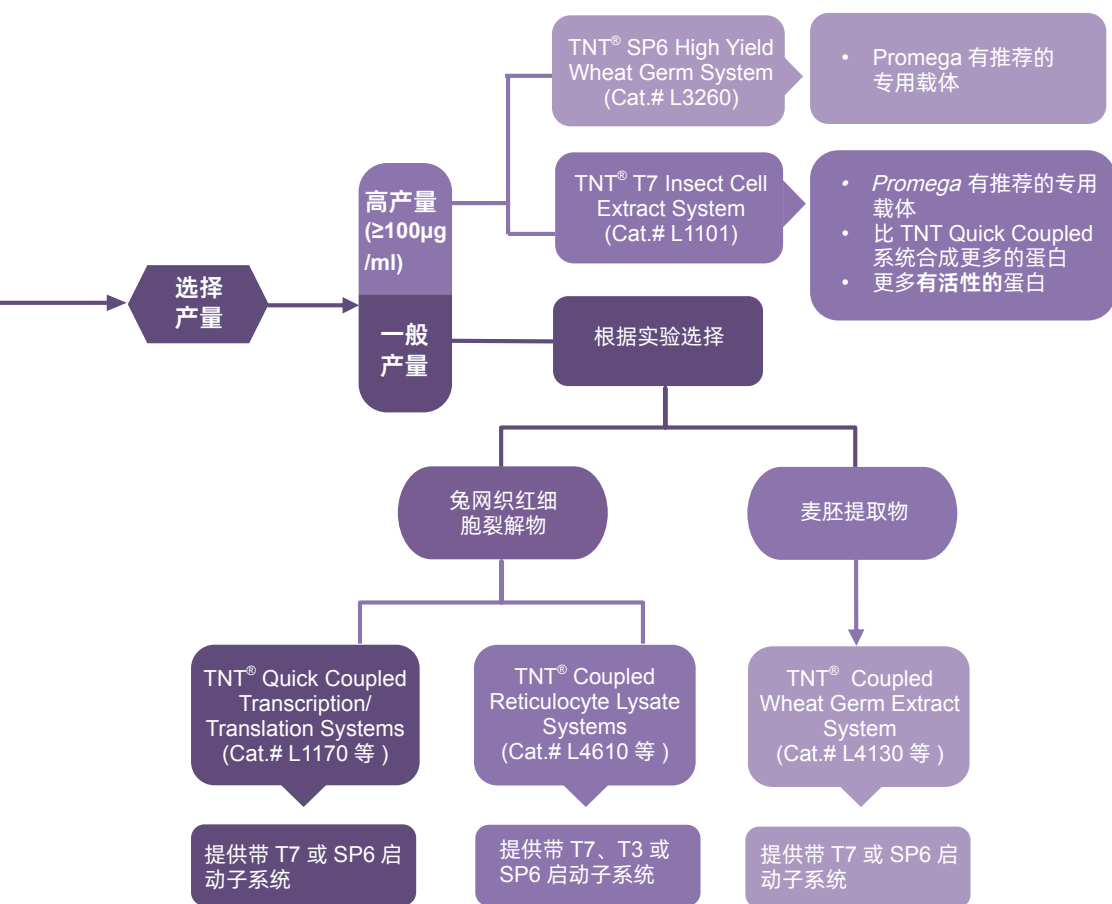
图 2. 无细胞蛋白表达系统选择示意图

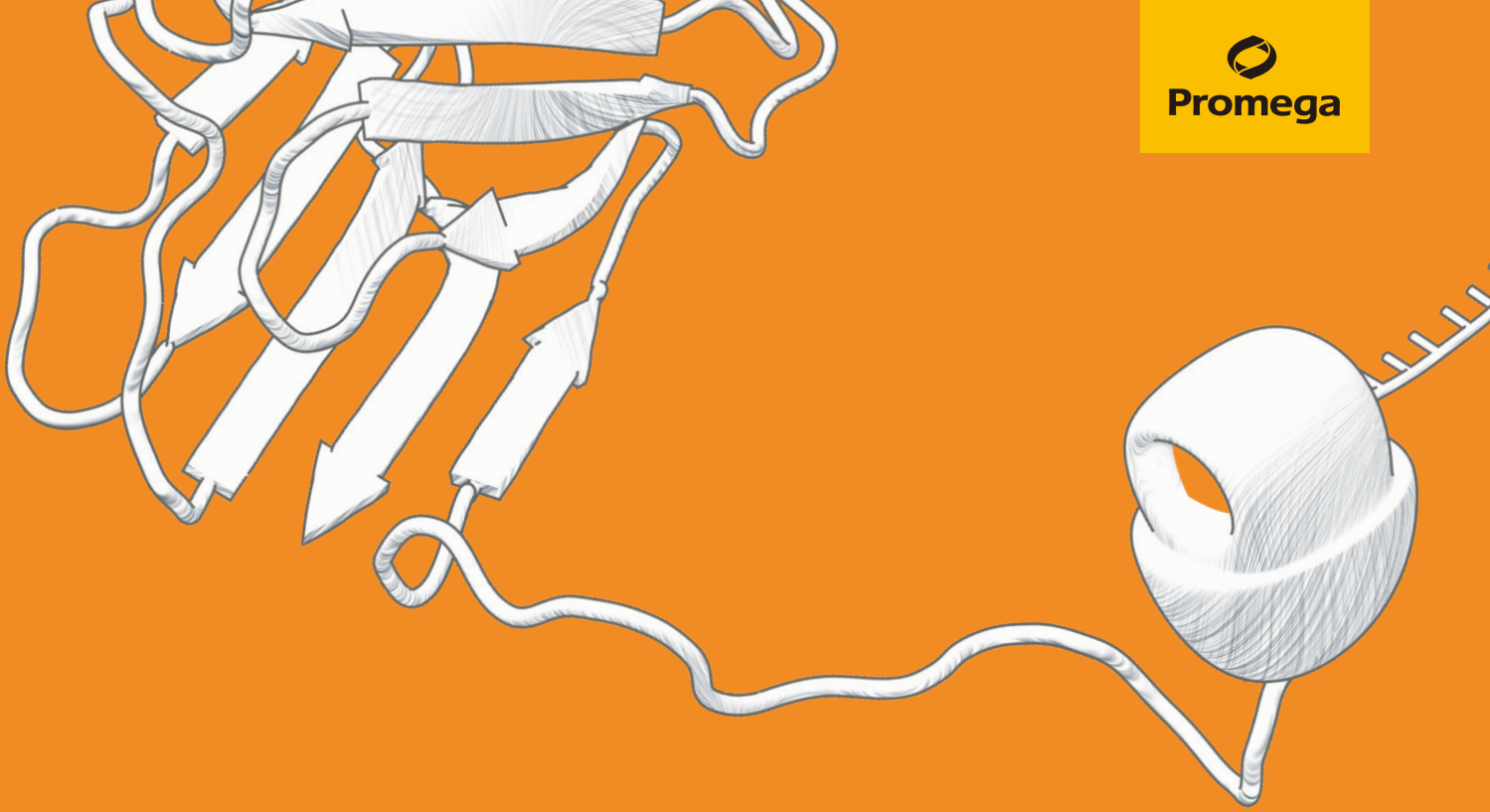


Promega 可提供从原核和真核来源的许多不同的无细胞表达系统。系统的选择取决于几个因素，包括模板 RNA 和 DNA 的来源、蛋白质产量或目的蛋白是否需要翻译后修饰（例如核心糖基化）。我们提供真核来源的翻译系统（基于 mRNA）和真核以及原核来源的转录 / 翻译偶联系统（DNA）。表 2 提供了翻译系统的概述，表 3 提供了转录 / 翻译偶联系统的概述。

对于选择合适的无细胞蛋白表达系统，需要考虑很多因素，包括您将使用的模板类型、您期望获得的蛋白质产率以及预期的下游应用。

迄今为止，最常用的商业化体外翻译系统包括大肠杆菌、小麦胚芽、兔网织红细胞或昆虫细胞提取物。由于每种细胞的表现和作用方式不同，因此其衍生的提取物也各不相同，每种都具有各自的优势和缺点，图 2 将为大家进行综合介绍。





基于 mRNA 的翻译系统

Translation Systems: mRNA-based

无细胞翻译系统用于体外转录的 mRNA 或从组织或细胞分离的 mRNA 的蛋白质表达。这些系统用于在高通量应用（例如显示技术）中表达单个蛋白质以及多个蛋白质。此外，无细胞翻译系统可用于功能和结构 RNA 分析，或研究翻译机制的各个方面。真核翻译系统来源于兔网织红细胞裂解物（RRL）或小麦胚芽提取物（WGE）。我们提供三种基于 mRNA 的翻译系统。用微球菌核酸酶处理提取物以破坏内源性 mRNA，从而将背景翻译降至最低（表 3.2）。

Flexi[®] Rabbit Reticulocyte Lysate System（Flexi[®] 兔网织红细胞裂解物系统）通过允许针对各种参数（包括 Mg²⁺ 和 K⁺ 浓度）优化转化反应，在反应条件下提供了更大的灵活性。小麦胚芽提取物是 RRL 系统的有用的替代选择，可用于表达小蛋白质或表达已知在 RRL 中含量丰富的蛋白质。目前从植物、酵母或其他真菌中表达蛋白质的研究人员，也可能发现 Wheat Germ Extract 比 RRL 更合用。

使用 mRNA 作为模板的无细胞翻译系统概述

Overview of Cell-Free Translation Systems that use mRNA as a Template

表 2.

Translation System	Rabbit Reticulocyte Lysate System, Nuclease-Treated	Flexi [®] Rabbit Reticulocyte Lysate **	Wheat Germ Extract
目录号	L4960	L4540	L4380
核酸酶处理	+	+	+
标记选择 *	Met, Cys, Leu, FluoroTect [™] ; Transcend [™]	Met, Cys, Leu, FluoroTect [™] ; Transcend [™]	Met, Cys, Leu, FluoroTect [™] ; Transcend [™]
萤光素酶对照 RNA	+	+	+
蛋白得率	1–4 µg/ml	1–4 µg/ml	0.6–3 µg/ml

* 裂解物提供有三种氨基酸混合物，用于掺入标记的氨基酸，如蛋氨酸、半胱氨酸和亮氨酸。Transcend[™] tRNA (Cat.# L5070; L5061) 和 FluoroTect[™] (Cat.#L5001) 可用于掺入生物素化或荧光标记的赖氨酸残基。

** 该系统提供比标准兔网织红细胞裂解物系统更大的反应条件灵活性。Flexi[®] Rabbit Reticulocyte Lysate System (Flexi[®] 兔网织红细胞裂解物系统) 允许针对各种参数优化翻译反应，包括 Mg²⁺ 和 K⁺ 浓度以及添加 DTT 的选项。

Rabbit Reticulocyte Lysate System, Nuclease-Treated

从 mRNA 开始的体外蛋白质合成。

描述

Rabbit Reticulocyte Lysate (RRL), Nuclease-Treated, 通过添加几种补充剂优化 mRNA 翻译。其中包括血红素, 它阻止血红素调节的 eIF-2a 激酶的激活; 由磷酸肌酸激酶和磷酸肌酸组成的能量产生系统; 小牛肝脏 tRNA, 以平衡内源的 tRNA 群体, 从而优化密码子的使用并扩大可有效翻译的 mRNA 的范围。此外, 用微生物核酸酶处理裂解物以消除内源性 mRNA。RRL 通过磷酸化、乙酰化和异戊二烯化对蛋白质进行翻译后修饰。信号肽裂解和核心糖基化也可以通过添加犬腺微粒体膜来实现。其他应用见表 1。

反应原理

在 RRL 翻译反应中, mRNA 被用作翻译的模板。一般而言, 在 30°C 下孵育 1.5 小时后将获得最佳结果。然而, 许多与模板相关的因素影响翻译效率并且在设计体外翻译实验时应考虑。特定转录物的最佳 mRNA 浓度会有所不同, 应根据经验确定。此外, 某些核酸序列元素的存在可以对起始保真度和翻译效率产生深远影响。Poly (A) + 尾、5'-帽、5'-未翻译区域和 AUG 起始密码子 (或序列中的次要 AUG) 周围的序列上下文都可能影响给定 mRNA 的翻译。

功能和优点

- **一致性:** 每个批次的可靠和一致的翻译。
- **经过优化, 易于使用:** 经处理的兔网织红细胞裂解物为翻译而优化。
- **方便:** 包括萤光素酶阳性对照 RNA。

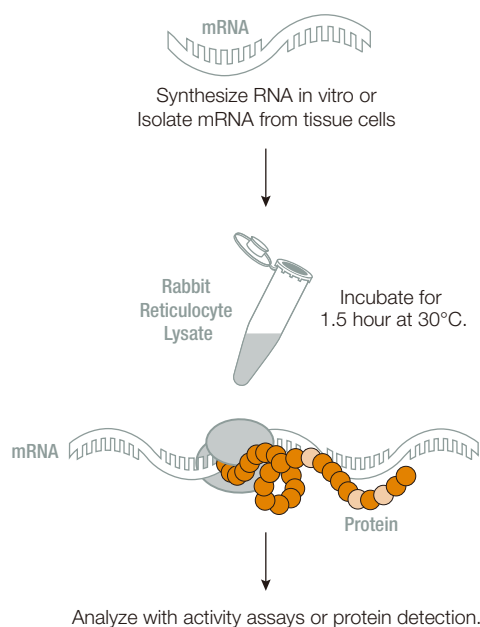


图 3. 使用兔网织红细胞裂解物的体外翻译简要流程图。

订购信息

产品	规格	目录号
Rabbit Reticulocyte Lysate System, Nuclease Treated	30 reactions	L4960

Flexi[®] Rabbit Reticulocyte Lysate System

从 mRNA 开始的体外蛋白质合成。优化低表达 mRNA 的翻译。

描述

Flexi[®] Rabbit Reticulocyte Lysate System 广泛用于鉴定 mRNA 种类和表征其产物。相比于 Rabbit Reticulocyte Lysate, Nuclease-Treated, Flexi[®] Rabbit Reticulocyte Lysate System (目录号: L4540) 提供了更加灵活的反应条件, 通过对翻译反应在广泛的参数范围进行优化 (包括 Mg²⁺ 和 K⁺ 浓度), 其他应用见表 1。

反应原理

与标准的 Rabbit Reticulocyte Lysate 一样, Flexi[®] Rabbit Reticulocyte Lysate System 通过添加以下补充物来优化翻译: 其中包括血红素, 可防止对起始因子 eIF-2 α 的抑制; 由预先测试的磷酸肌酸激酶和磷酸肌酸组成的能量再生系统; 小牛肝 tRNA, 可平衡内源性的 tRNA 群体, 从而优化密码子的使用, 并扩大可有效翻译的 mRNA 范围; 以及微球菌核酸酶消除内源性 mRNA, 从而减少背景翻译。据报道, 该真核系统通过磷酸化、乙酰化和异戊二烯化对蛋白质进行翻译后修饰。添加犬胰腺微粒体膜 (Canine Pancreatic Microsomal Membranes) 后, 可发生信号肽切割和核心糖基化。相比于标准的 RRL 系统, Flexi[®] Rabbit Reticulocyte Lysate System 提供更加灵活的反应条件。

功能和优点

- **一致性:** 每个批次的可靠和一致的翻译。
- **易于优化:** 为了帮助优化镁浓度, 为每批 Flexi[®] Lysate 提供了内源性镁浓度。
- **方便:** 包括萤光素酶阳性对照 RNA 和检测试剂。

订购信息

产品	规格	目录号
Flexi [®] Rabbit Reticulocyte Lysate System	30 reactions	L4540

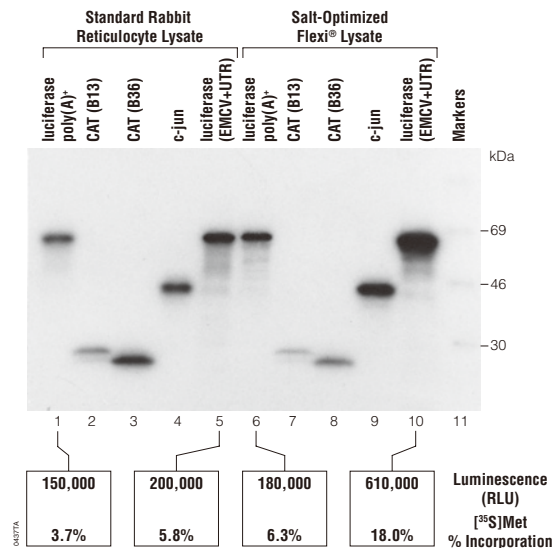


图 4. 标准的和盐优化的兔网织红细胞裂解物翻译的比较。

来自标准的 (泳道 1-5) 或 Flexi[®] Lysate (泳道 6-10) 反应的样品在 4-15% 梯度 SDS 聚丙烯酰胺凝胶上进行分离, 并通过放射自显影进行分析。每 50 μ l 反应包含 1 μ g RNA、20 μ Ci[³⁵S] 蛋氨酸和 Amino Acid Mixture Minus Methionine。反应在 30 $^{\circ}$ C 下孵育 90 分钟。翻译反应用以下质粒构建体产生的五种不同 RNA 进行:

- 泳道 1 和 6, pPOLY(A)-*luc*;
- 泳道 2 和 7, B13 (CAT);
- 泳道 3 和 8, B38 (CAT);
- 泳道 4 和 9, c-jun (转录因子);
- 泳道 5 和 10, pEMCV UTR *luc*。

泳道 11 包含 [¹⁴C] 分子量标准品。

萤光素酶产物的两种检测方法如下所示: 以相对光单位 (RLU) 测量的发光 (2.5 μ l 翻译体系 + 50 μ l Luciferase Assay Reagent, 10 秒整合) 和 [³⁵S] 蛋氨酸的掺入百分比 (通过 0.5 μ l 翻译反应的 TCA 沉淀确定)。

Wheat Germ Extract

从 mRNA 开始的体外蛋白质合成。

描述

Wheat Germ Extract(WGE) 是一种经过良好加工和优化的小麦胚芽提取物。它含有蛋白质合成所必需的细胞成分 (tRNA、核糖体以及起始、延伸和终止因子)。该提取物通过补充能量再生系统 (磷酸肌酸 / 磷酸肌酸激酶) 和亚精胺, 以刺激链延伸的效率。只有添加外源氨基酸和 mRNA 才能启动翻译。醋酸钾可用于优化多种 mRNA 的翻译。其他应用见表 1。

反应原理

Wheat Germ Extract 是 Rabbit Reticulocyte Lysate (RRL) 系统的有用替代物, 用于表达小蛋白或表达可能在 RRL 中含量丰富的蛋白。目前从植物、酵母或其他真菌中表达蛋白质的研究人员, 也可能发现 Wheat Germ Extract 比 RRL 更合用。

功能和优点

- **优化提取:** 帮助表达在 RRL 中表达不好的真核 mRNA。
- **灵活:** 提供三种氨基酸混合物, 可选择不同的放射性同位素。
- **强健:** 提供醋酸钾可增强多种 mRNA 的翻译。
- **方便:** 包括萤光素酶阳性对照 RNA。

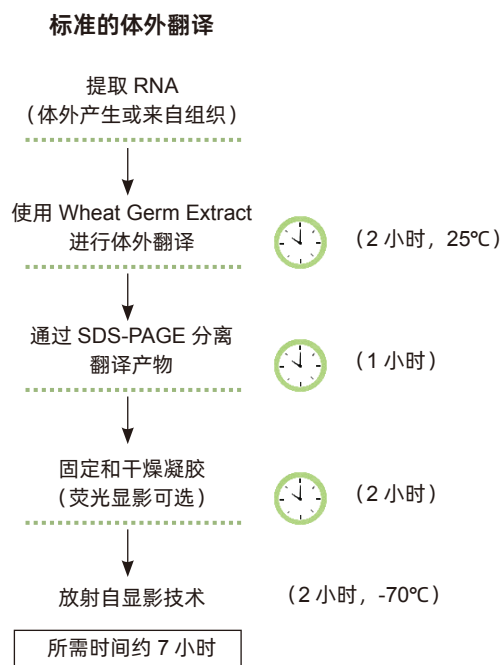


图 5. 使用 Wheat Germ Extract 的体外翻译过程流程图

订购信息

产品	规格	目录号
Wheat Germ Extract	5 x 200ul	L4380

Rabbit Reticulocyte Lysate System, Untreated

描述

Rabbit Reticulocyte Lysate (RRL), Untreated, 含有蛋白质合成所需的细胞成分 (tRNA、核糖体、氨基酸、起始、延伸和终止因子), 但未经微球菌核酸酶处理。未经处理的裂解物主要用于分离这些成分, 并作为内源性珠蛋白 mRNA 的丰富来源。未经处理的裂解物以与经处理裂解物相同的方式从新西兰白兔制备, 不同之处在于裂解物未经微球菌核酸酶处理。

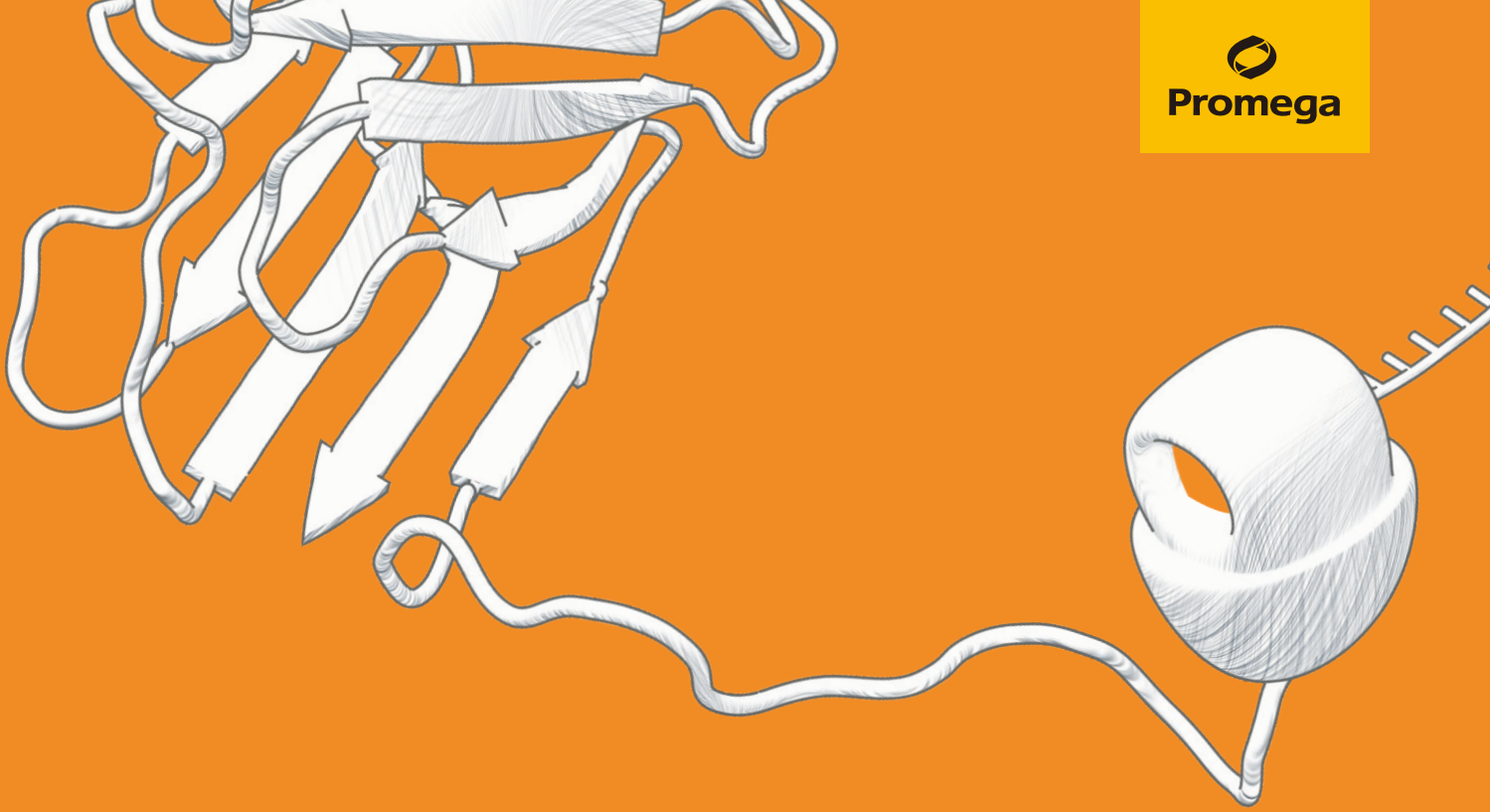
注: Rabbit Reticulocyte Lysate (RRL), Untreated, 未补充 tRNA、磷酸肌酸、磷酸肌酸激酶、DTT、乙酸钾、氯化镁或氯化血红素。当补充氯化血红素 (最终浓度为 20 μ M) 时, Rabbit Reticulocyte Lysate, Untreated 从添加的 mRNA 模板中合成蛋白质的速度与 Rabbit Reticulocyte Lysate (RRL), Nuclease-Treated 的速度大致相同, 持续 60 分钟。未经处理的兔网织红细胞裂解物可通过 [操作说明 TM232](#) 中列出的成分进一步优化。

特点

- 含有蛋白质合成所需的 tRNA、核糖体、氨基酸、起始、延伸和终止因子, 主要用于分离这些成分, 并作为内源性珠蛋白 mRNA 的丰富来源。
- 无微球菌核酸酶处理。
- 每个批次的网织红细胞产量一致。

订购信息

产品	规格	目录号
Rabbit Reticulocyte Lysate System, Untreated	1 ml	L4151



基于 DNA 的转录 / 翻译系统

Transcription and Translation Systems: DNA-based

转录和翻译 (TNT[®]) 偶联系统可在单管中同时实现真核生物体外转录和翻译等多种过程, 其工作效率极高, 为研究人员提供了节省时间的替代方案。TNT[®] 系统可用于低通量至高通量功能基因组和蛋白质组分析中的多种应用, 如表 1 所示。TNT[®] 系统和 T7、T3 或 SP6 RNA 聚合酶一起提供, 因此可实现克隆在 T7、T3 或 SP6 启动子下游的 DNA 进行蛋白表达。

基于 DNA 的转录 / 翻译系统概述

Overview of Transcription and Translation Systems: DNA-based

Promega 提供的 TNT[®] 系统来源于真核生物（兔网织红细胞、小麦胚芽和昆虫细胞）以及原核生物大肠杆菌提取物（参见表 3）。通常情况下，使用大肠杆菌提取物可达到最高水平的蛋白产生速率。然而，真核表达系统往往会产生活性更高的真核蛋白。因此，在选择无细胞表达系统时，需考虑靶蛋白的来源这一问题。

<p>DNA 模板考虑因素： 质粒和 PCR- 片段</p>	<p>无细胞系统的表现性能取决于所使用的 DNA 模板。基本上，任何含有 T7、SP6 或 T3 启动子的载体均可在 TNT[®] 系统上进行使用。然而，在对 DNA 片段或质粒进行相应改造以使其在真核系统中实现最佳表达水平时，需综合考虑以下几个方面：</p> <ul style="list-style-type: none">(i). 序列中的 ATG 起始密码子应为转录起始位点之后遇到的第一个 ATG；(ii). 理想情况下，在启动子之后，ATG 包含在 Kozak 共有序列中；(iii). 在序列的 3'- 末端应包含终止密码子；(iv). 在终止密码子之后，应包含一个合成的 poly(A) 尾。 <p>此外，TNT[®]T7 Coupled Wheat Germ System 中使用的载体应呈线性或在环状模板中具有 T7 转录终止子。</p> <p>在原核系统中，起始密码子的选择通常取决于是否存在核糖体结合位点（RBS；Shine-Dalgarno 序列），其包含标记读码框起始的信号。当存在最佳 RBS 时，其可大大增加原核系统中的表达水平。原核系统不能识别 ATG 起始密码子上游存在的 ATGs，除非起始密码子包含一个正确定位的 RBS。</p>
	<p>上述有关模板的注意事项也适用于使用 PCR 片段作为 TNT[®] 反应模板的情况。如果需要生成在真核系统中进行蛋白表达所需的 PCR 片段，建议在 T7 或 SP6 启动子下游整合一段 Kozak 序列（参见图 5）。</p>
<p>体外合成过程中 蛋白质的标记</p>	<p>所有 TNT[®] 系统均提供三种不同的氨基酸混合物，用于掺入放射性标记的氨基酸，例如蛋氨酸、半胱氨酸和亮氨酸。Transcend[™] tRNA 和 FluoroTect[™] 系统可用于掺入生物素化或荧光标记的赖氨酸残基。</p>
<p>信号肽切割和 核心糖基化</p>	<p>据相关研究报道，兔网织红细胞裂解物可通过磷酸化、乙酰化和异戊二烯化等过程对蛋白质进行翻译后修饰。然而，需要向 RRL 中加入 Canine Pancreatic Microsomal Membranes（CMM），以实现信号肽切割和翻译产物的核心糖基化过程。</p>

表 3

产品	载体 DNA (环状或 线性化)	PCR 产生 的 DNA	需要 RBS ¹	优先选择 Kozak ²	标记 选择	用 CMM 进行 信号切割 & 糖基化 ³	对照 DNA & 检测 试剂 ⁴	得率
Rabbit	TNT [®] Coupled Reticulocyte Lysate System (T7, T3, or SP6 RNA Polymerase; Cat.# L4610, L4950, L4600) ⁵	+ ⁶	+ ⁷	-	+	Met, Cys, Leu, FluoroTect™, Transcend™	+	3–6µg/ml
	TNT [®] Quick Coupled Transcription/Translation (T7 or SP6 RNA Polymerase; Cat.# L1170, L2080)	+ ⁶	+ ⁷	-	+	Met, FluoroTect™, Transcend™	+	3–6µg/ml
	TNT [®] T7 Quick for PCR DNA (Cat.# L5540)	NR	+	-	+	Met, FluoroTect™, Transcend™	-	3–6µg/ml
Wheat Germ	TNT [®] Coupled Wheat Germ (T7 or SP6 RNA Polymerase) (Cat.# L4130, L4140) ⁴	+ ⁸	+ ⁷	-	+	Met, Cys, Leu, FluoroTect™, Transcend™	+	3–6µg/ml
	TNT [®] SP6 High-Yield Wheat Germ Protein Expression System (Cat.# L3260)	+	+	-	+	Met, Cys, Leu, FluoroTect™, Transcend™	-	10–100 µg/ml
Insect	TNT [®] T7 Insect Cell Extract Protein Expression System (Cat.# L1101)	+	NR	-	+	Met, Cys, Leu, FluoroTect™, Transcend™	Control DNA	15–75 µg/ml
<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> S30 for Linear DNA (Cat.# L1030) relies on endogenous RNA polymerases	+ ⁹	+	+	-	Met, Cys, Leu, FluoroTect™, Transcend™	+	1–5µg/ml
	S30 T7 High-Yield Protein Expression System (Cat.# L1110)	+	NR	+	-	Met, Cys, Leu, FluoroTect™, Transcend™	Control DNA	200–500 µg/ml
	<i>E. coli</i> T7 S30 Extract System for Circular DNA (cat# L1130)	+	-	+	-	Met, Cys, Leu, FluoroTect™, Transcend™	Control DNA	1–5µg/ml
	<i>E. coli</i> S30 Extract System for Circular DNA (cat# L1020)	+	-	+	-	Met, Cys, Leu, FluoroTect™, Transcend™	Control DNA	1–5µg/ml

NR: 不推荐

1. TNT[®] *E. coli* Systems 的 DNA 模板需要 Shine Dalgarno 核糖体结合位点 (RBS)。
2. 真核 TNT[®] Systems 的 DNA 模板应优选包含用于翻译起始的 Kozak 共识序列。
3. CMM: 犬微粒体膜。
4. 对照 DNA 含有萤火虫萤光素酶基因。萤光素酶活性由萤光素酶检测试剂 (Luciferase Assay Reagent, Cat.#E1500) 检测。
5. 通过添加 Mg²⁺ 和 K⁺ 可以进一步优化翻译反应。
6. SP6 环状质粒比 T7 或 T3 环状质粒产生更高的产量; T7 或 T3 线性化质粒可以被当作模板; SP6 线性化质粒不建议使用。
7. 不建议用于包含 SP6 的模板。
8. 用于包括 T7 终止序列的 T7 环状质粒; 否则优选线性化质粒; 对于 SP6 模板, 只有环状质粒。
9. 仅用于线性化模板。

TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems

强大的真核无细胞表达系统，用于在简单的一步法中表达功能性哺乳动物的蛋白质。

描述及反应原理

我们可提供两种类型的 Rabbit Reticulocyte Lysate Transcription and Translation (TNT®) System: TNT® Coupled(T7、T3、SP6)System 和 TNT® Quick Coupled(T7、SP6)System。这两种系统之间的主要区别是 TNT® Quick Coupled System 提供了 TNT® 快速混合母液 (master mix)，其中包含一个试管中所需使用的所有反应组分，而 TNT® Coupled System 的所有反应组分则在单独的试管中予以提供 (参见下图 7)。TNT® T7 Quick for PCR DNA 是一种快速、方便使用的耦联 TNT® 系统，旨在用于表达使用 PCR 生成的 DNA 模板。该系统性能强健，并且能够表达分子量在 10~150kDa 之间的多种蛋白。裂解物和进行 TNT® 反应所需的所有试剂一并提供，包括 RNA 聚合酶。在使用这些系统进行分析时，首先将 DNA 直接加入 TNT® 裂解物中，并在 50µl 的反应体系中于 30°C 孵育 60~90 分钟。其他相关应用请参见表 1。

功能和优点

- **应用广泛：** TNT® 系统广泛用于功能基因组学和蛋白质组学分析。
- **节省时间：** TNT® 反应最长在 1.5 小时内完成。
- **完整系统：** 提供 TNT® 反应的所有试剂 (标记的氨基酸除外)。
- **系统可靠：** 可通过使用体外哺乳动物系统消除溶解度问题。

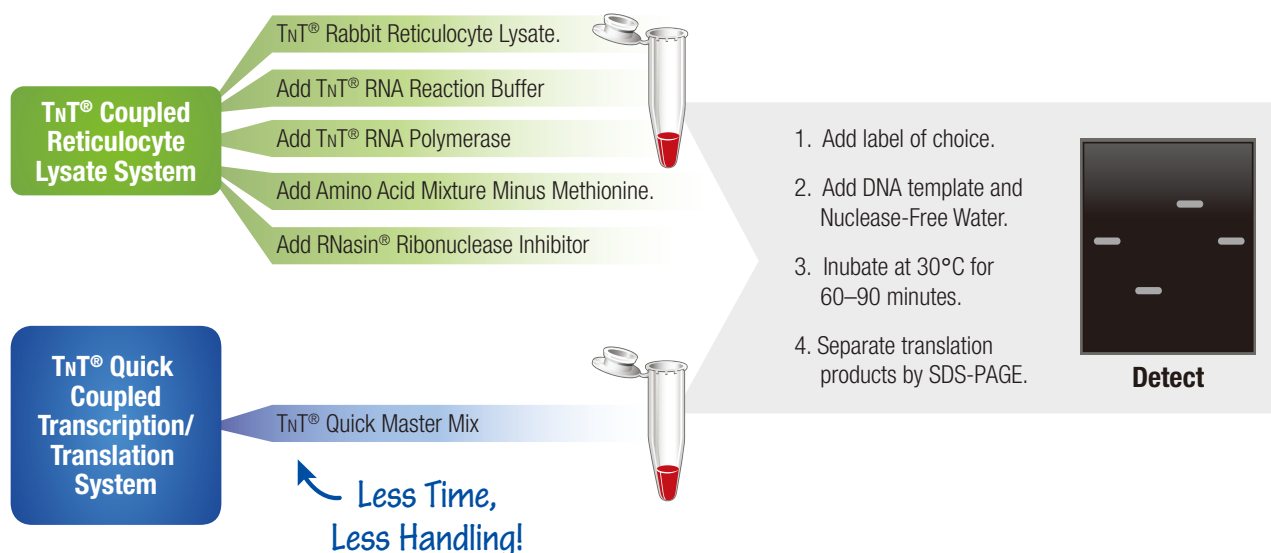


图 6. TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System 和 TNT® Quick Coupled Transcription/Translation System 的流程比较。

真核生物

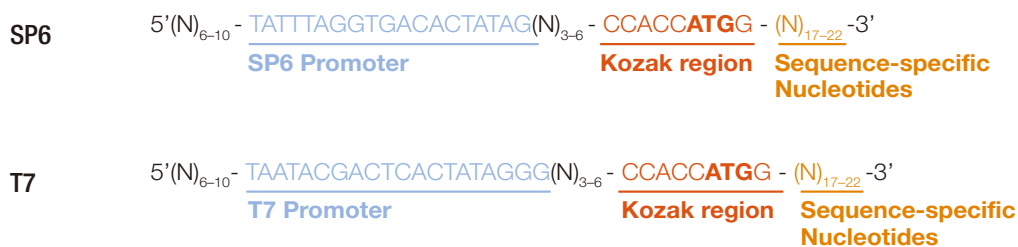


图 7. 用于在 TNT® 系统中进行蛋白质表达时产生 PCR 片段的正向引物。

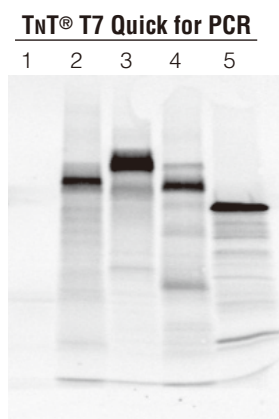


图 8. TNT® T7 Quick for PCR 用于表达 APC 基因和 BRCA1 基因的突变体。PCR 片段用作 TNT® 反应的起始材料。Transcend™ tRNA 包含在生物素化赖氨酸残基的掺入反应中。

- Lane 1: 无 DNA 对照;
- Lane 2: APC Seg 2 PCR 片段;
- Lane 3: APC Seg 3 PCR DNA 片段;
- Lane 4: BRCA1 Seg 3 PCR 片段;
- Lane 5: 荧光素酶 T7 质控 DNA。

订购信息

产品	规格	目录号	推荐模板
TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System			
TNT® SP6 Coupled Reticulocyte Lysate System	40 reactions	L4600	质粒 PCR 产物
	8 reactions	L4601	
TNT® T7 Coupled Reticulocyte Lysate System	40 reactions	L4610	
	8 reactions	L4611	
TNT® T3 Coupled Reticulocyte Lysate System	40 reactions	L4950	
TNT® T7/T3 Coupled Reticulocyte Lysate System	40 reactions	L5010	
TNT® T7/SP6 Coupled Reticulocyte Lysate System	40 reactions	L5020	
TNT® Quick Coupled Transcription/Translation Systems			
TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System	5 reactions	L1171	含 T7 启动子的质粒 DNA 和 PCR 产物
	40 reactions	L1170	
TNT® SP6 Quick Coupled Transcription/Translation System	5 reactions	L2081	含 SP6 启动子的环状质粒 DNA
	40 reactions	L2080	
TNT® T7 Quick for PCR DNA	40 reactions	L5540	含 T7 启动子的 PCR 产物

TNT[®] Coupled Wheat Germ Extract System

从 DNA 开始的体外蛋白质合成。

描述

TNT[®] Coupled Wheat Germ Extract System (TNT[®] 麦胚提取物转录 / 翻译偶联系统) 为研究者提供了一个可应用于真核生物的无细胞蛋白表达方法, 它是一个转录 / 翻译偶联的、在一个试管中即可完成实验的系统。TNT[®] 提取物系统大大简化了体外翻译过程, 缩短了获得翻译结果所需的时间。使用麦胚提取物进行体外翻译的常规方法一般采用由 SP6 或 T7 RNA 聚合酶启动子在体外合成的 RNA 作模板, 整个过程包括多个独立的反应, 且每个反应之间好几个步骤。TNT[®] 提取物系统将转录反应的组分直接整合到翻译反应中, 形成混合物, 避开了常规方法的繁琐步骤。

反应原理

TNT[®] 小麦胚芽提取系统有三种配置, 用于转录和翻译从 SP6 或 T7 RNA 聚合酶启动子下游克隆的基因。使用该系统, 用 0.2–2 μ g 模板编程 50 μ l 反应, 并在 30 $^{\circ}$ C 下孵育 1.5 小时。以下模板可用于此系统:

- 含有 SP6 RNA 聚合酶启动子的环状质粒 DNA。
- 含有 T7 RNA 聚合酶启动子的线性化质粒 DNA。
- 含有 T7 RNA 聚合酶启动子和 T7 转录终止子的环状质粒 DNA。

特点

- 产生比标准小麦胚芽系统多 2 至 6 倍的蛋白质。
- 1.5 小时内从线性化 DNA 中生产蛋白质。
- 可以选择启动子。

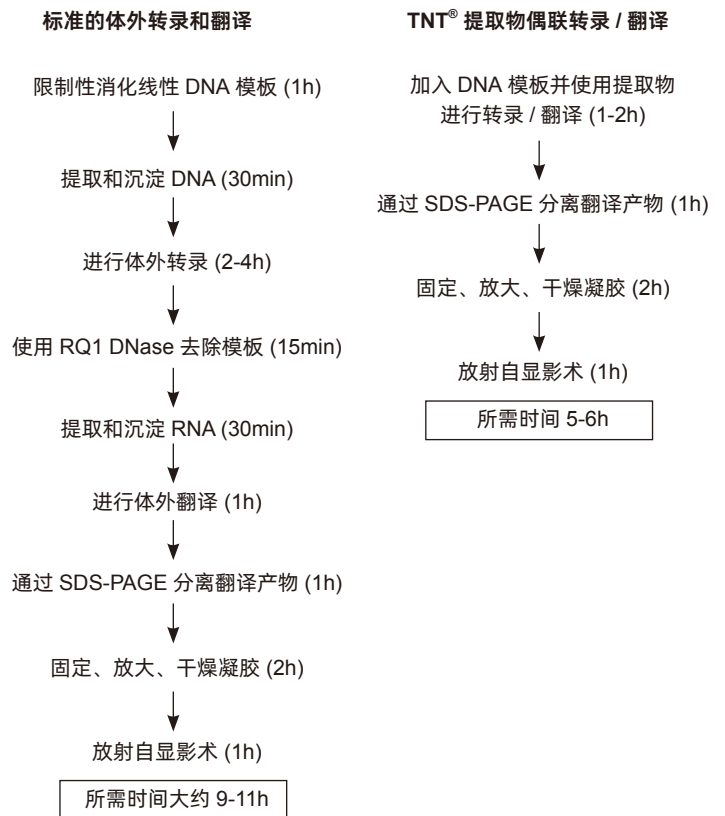


图 9. 标准体外转录和翻译流程与 TNT[®] 提取物偶联转录 / 翻译流程的比较。

订购信息

产品	规格	目录号
TNT [®] SP6 Coupled Wheat Germ Extract System	40 reactions	L4130
TNT [®] T7 Coupled Wheat Germ Extract System	40 reactions	L4140
TNT [®] T7/SP6 Coupled Wheat Germ Extract System	40 reactions	L5030

TNT® SP6 High-Yield Wheat Germ Protein Expression System

从 DNA 开始的体外蛋白质合成。

描述

TNT® SP6 High-Yield Wheat Germ Protein Expression System 是一种方便、快速、单管即可完成的转录 / 翻译偶联系统，用于表达浓度水平高达 100µg/ml 的蛋白。TNT® SP6 High-Yield Wheat Germ Protein Expression System 可表达克隆在 SP6 RNA 聚合酶启动子下游的基因。这种无细胞表达系统采用经优化的小麦胚芽提取物制备而成，并含有直接从 DNA 模板合成蛋白质所必需的所有组分（tRNA、核糖体、氨基酸、SP6 RNA 聚合酶以及翻译起始、延伸和终止因子）。其他相关应用请参见表 1。

反应原理

TNT® SP6 High-Yield Wheat Germ Protein Expression System 可与标准质粒 DNA 或使用 PCR 生成的、含有 SP6 启动子的模板一起使用。然而，为达到最佳产量，建议使用专为小麦胚芽提取物研发的专用载体，如 pF3A WG (BYDV) Flexi® Vector 或 pF3K WG (BYDV) Flexi® Vector。进行操作时，将 DNA 模板直接加入 SP6 High Yield Master Mix 中，并在 50µl 的反应体系中于 25°C 孵育 2 小时。表达的蛋白质可以直接使用或经过纯化后用于相关应用。

功能和优点

- **节省时间：**与使用基于细胞的（大肠杆菌）系统相比（数天），两小时内即可生成蛋白质。
- **选择您的模式：**使用质粒或 PCR 生成的模板。
- **生成全长蛋白：**生成可溶性全长蛋白质，避免与大肠杆菌系统相关的问题。

订购信息

产品	规格	目录号
TNT® SP6 High-Yield Wheat Germ Protein Expression System	40 reactions	L3260
	10 reactions	L3261

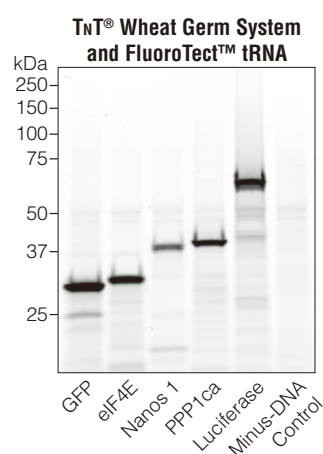


图 10. 在 FluoroTect™ tRNA 对赖氨酸残基标记下，使用 TNT® SP6 麦胚高产率蛋白表达系统表达不同大小和来源的蛋白质。通过 SDS-PAGE 分离样品并使用荧光扫描仪成像。

TNT[®] T7 Insect Cell Extract Protein Expression System

从 DNA 模板开始的体外蛋白质合成。

描述

TNT[®] T7 Insect Cell Extract Protein Expression System 是一种方便、快速、单管即可完成的转录和翻译偶联系统，用于无细胞蛋白表达。其他应用见表 1。

反应原理

提取物由常用的 *Spodoptera frugiperda* Sf21 细胞系制成。TNT[®]T7 Insect Cell Extract (ICE) Master Mix 中含有转录和翻译所需使用的所有组分。蛋白质由 ICE 载体（例如 pF25A 或 pF25K ICE T7 Flexi[®] Vector）中克隆在 T7 启动子下游的基因进行表达。这些载体含有杆状病毒多角体蛋白基因的 5'- 和 3'- 非翻译（UTR）序列，其可有效提高翻译效率。在加入 DNA 模板后，就会开始蛋白质合成过程。反应液置于 28~30°C 进行孵育，并在 4 小时内完成。使用 TNT[®]T7 Insect Cell Extract Protein Expression System 可产生浓度水平约为 15~75µg/ml 的功能性蛋白。

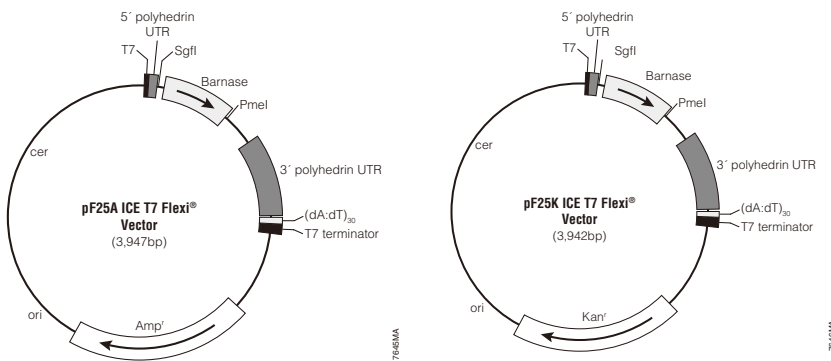


图 11. ICE 载体图谱。Flexi 载体含有 Barnase 致死基因，和 SgfI 和 PmeI 稀有酶切位点，方便在 Flexi 载体之间快速克隆。

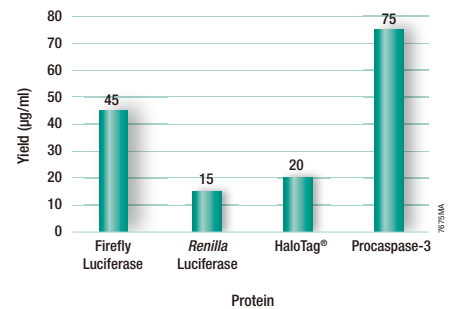


图 12. 使用 TNT[®] T7 Insect Cell Extract Protein Expression System 典型的蛋白产率。

功能和优点

- 快速获得数据：4 小时内即可完成蛋白表达。
- 收获高产量蛋白：蛋白表达量高达 75µg/ml。
- 方便：包括荧光素酶质控 DNA。

订购信息

产品	规格	目录号
TNT [®] T7 Insect Cell Extract Protein Expression System	40 reactions	L1102
	10 reactions	L1101

E. coli S30 Extract System for Linear Templates

从 DNA 开始的体外蛋白质合成。

描述

E. coli S30 Extract System for Linear Templates 可实现线性 DNA 模板的成功转录 / 翻译。进行操作时，仅需要提供含有原核生物大肠杆菌样启动子的线性 DNA（例如 lacUV5、tac、λPL (con) 和 λ-P_R）即可。此外，需要具有核糖体结合位点来指导体外蛋白质的合成过程。从缺乏大肠杆菌启动子的 DNA 模板中体外生成的 RNA 也可用于该系统，但蛋白质产量将下降到从线性 DNA 模板中产生的蛋白质产量的 1-10%。

反应原理

S30 Extract for Linear Templates 使用大肠杆菌 B 菌株 (SL119) 予以制备，其不具有 *OmpT* 内源蛋白酶、Ion 蛋白酶和核酸外切酶 V (*recBCD*)。蛋白酶活性的缺失会导致表达蛋白的稳定性更高。与先前描述的核酸酶缺失、*recBC* 来源的 S30 提取物相比，SL119 菌株的 *recD* 突变可产生活性更高的 S30 Extract for Linear DNA。但是，S30 Extract for Linear Templates 的活性低于 S30 Extract System for Circular DNA。使用所提供的萤光素酶检测试剂 (Luciferase Assay Reagent) 进行易于操作的、非放射性的阳性对照反应，可检测使用线性模板的 *E. coli* S30 System 中的萤光素酶基因表达水平。对照反应可产生长达数分钟的高光输出，同时研究人员可从多种检测方法中进行选择，包括进行较为直观的发光信号可视化观察。

功能和优点

- **灵活：**可以使用多种模板：DNA 片段、PCR 合成的 DNA、连接的重叠寡核苷酸、体外生成的 RNA 和原核 RNA。
- **完整：**包含转录 / 翻译偶联的所有必要组分。
- **优化：**预混液针对每批 S30 提取物进行了优化。
- **对照 DNA：**使用（包括）萤光素酶检测试剂 (Luciferase Assay Reagent) 轻松检测萤火虫萤光素酶表达。

订购信息

产品	规格	目录号
<i>E. coli</i> S30 Extract System for Linear Templates	30 reactions	L1030

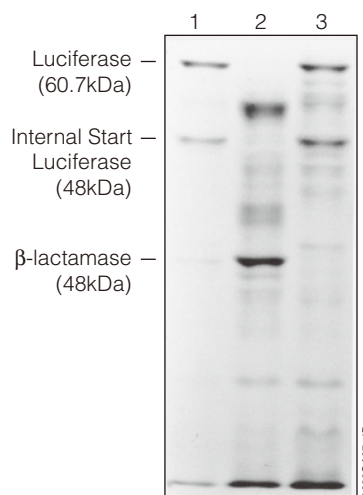


图 13. 使用 *E. coli* S30 Extract System for Linear Templates 对线性 DNA 模板进行体外转录 / 翻译偶联反应。

通过 SDS-PAGE 进行蛋白质分析，随后进行荧光显影（曝光 45 分钟）。将每种 50μl 反应混合液的 5ul 加入每个泳道。

泳道 1 显示由 2μg pBESTluc™ DNA 合成的蛋白质产物，用 Xho I 线性化。全长萤光素酶在 60kDa 迁移，β-内酰胺酶在 31.5kDa 迁移。明显的内部翻译开始导致 48kDa 的第二个主要基因产物。

泳道 2 显示 S30 反应（含有 4μg Cla I-digested pBESTluc™ DNA）的蛋白质产物。一种缺少 10kDa 天然萤光素酶羧基末端的截短萤光素酶多肽符合预期。还要注意，所有由推测的内部翻译产生的微弱蛋白质都在比泳道 3 少 10kDa 的位置开始迁移。

泳道 3 显示了从 PCR 产生的 DNA 合成的蛋白质产物（引物用于产生包含 Hind III 至 Xho I 区域的 pBESTluc™ DNA 的 PCR 产物）。

泳道 2 和 3 中的微弱条带（泳道 1 中不存在）显然是由内部翻译起始点引起的，当将过量的 DNA 添加到 S30 系统中就会显现出来。通过 Western blot 分析，这些条带被显示为截短的萤光素酶。

E. coli S30 Extract System for Circular DNA

从 DNA 开始的体外蛋白质合成。

描述

E. coli S30 Extract for Circular DNA (用于环状 DNA 模板的 *E. coli* S30 提取物系统) 简化了在质粒或 λ 载体中克隆的 DNA 序列的转录和翻译, 提供了鉴定和研究多肽特征的有力工具。研究者只需准备含有合适的原核启动子和核糖体结合位点的克隆 DNA 即可。这种提取物的制备采用并改进了 Zubay 描述的方法, 是从 OmpT 内蛋白酶和 Ion 蛋白酶活性缺失的大肠杆菌 B 株制得。从而极大地增强了表达蛋白的稳定性, 因为若在体内翻译的话, 表达的目标蛋白将会被蛋白酶降解。由于宿主编码的抑制物的存在, 某些蛋白在体内表达的水平很低, 使用 S30 体外系统可提高这些蛋白的翻译水平。

反应原理

S30 System for Circular DNA 包含针对每批 S30 提取物优化的无氨基酸的 S30 预混物, 也包括所有其他需要的组分, 有 rNTPs、tRNAs、ATP 再生系统、IPTG 和适当的盐。提供缺乏半胱氨酸、蛋氨酸或亮氨酸的氨基酸混合物以促进翻译产物的放射性标记。该系统还包括对照 DNA 模板, pBEST luc^{TM} 载体, 包含位于 *tac* 启动子下游的真核萤火虫萤光素酶基因和一个核糖体结合位点。使用提供的萤光素酶检测试剂 (Luciferase Assay Reagent), 可以通过非放射性方法很容易地检测 S30 System for Circular DNA 中萤光素酶基因的表达。该测定产生几分钟的高亮输出, 使研究人员能够从几种检测方法中进行选择, 包括简单的发光视觉观察。

特点

- 减少表达降解蛋白的机会。
- 包括偶联转录 / 翻译所需的所有组分。
- 产生极低水平的内源性蛋白质, 因此背景较低。

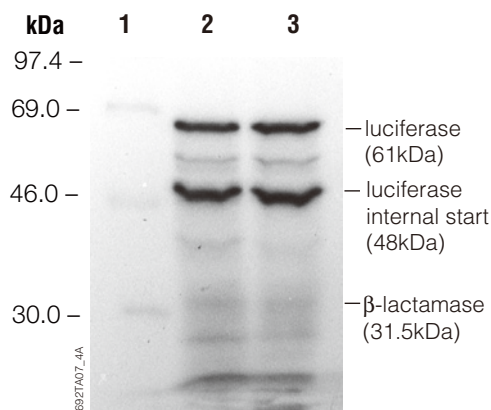


图 14. 使用 *E. coli* S30 Extract System for Circular DNA 对环状 DNA 模板进行体外转录 / 翻译。从每种 50 μ l 反应混合物中取 5 μ l 加入每个泳道。泳道 2 和 3 显示了由 2 μ g pBEST luc^{TM} DNA 合成的蛋白质产物。全长萤光素酶迁移至 61kDa。一个明显的内部翻译开始产生 48kDa 的第二个主要基因产物。 β -内酰胺酶迁移至 31.5kDa。泳道 1 显示分子量 marker; 泳道 2 和 3 是重复的翻译反应。

订购信息

产品	规格	目录号
<i>E. coli</i> S30 Extract System for Circular DNA	30 reactions	L1020
<i>E. coli</i> T7 S30 Extract System for Circular DNA	30 reactions	L1130

E. coli S30 T7 High-Yield Protein Expression System

从 DNA 开始的体外蛋白质合成。

描述

S30 T7 High-Yield Protein Expression System 是一种基于大肠杆菌提取物的蛋白合成系统。该系统通过提供含有用于转录的 T7 RNA 聚合酶的提取物和翻译需要的所有组分，简化了含有 T7 启动子的质粒或 λ 载体中克隆的 DNA 序列的转录和翻译过程。

反应原理

E. coli S30 T7 High-Yield Protein Expression System 从含有 T7 启动子和核糖体结合位点的质粒载体中，在 1 小时内表达浓度水平高达 500 μ g/ml 的蛋白。该蛋白表达系统提供的提取物含有用于转录的 T7 RNA 聚合酶，并且使 OmpT 内源蛋白酶和 Ion 蛋白酶活性缺失。系统中的所有其他必要组分均针对蛋白表达进行了优化。这些优化使得靶蛋白具有更高的稳定性并且提高了靶蛋白的表达水平。对照 DNA 表达可产生海肾萤光素酶，可在进行 SDS-PAGE 后使用考马斯亮蓝染色法进行检测或采用海肾萤光素酶检测系统 (*Renilla* Luciferase Assay System 目录号: E2810) 进行分析。

功能和优点

- 快速获得数据: 1 小时内即可完成蛋白表达。
- 收获高表达蛋白: 蛋白表达量高达 500 μ g/ml, 且应用广泛。
- 可扩展性: 方便的筛选流程, 用于高通量蛋白表达。

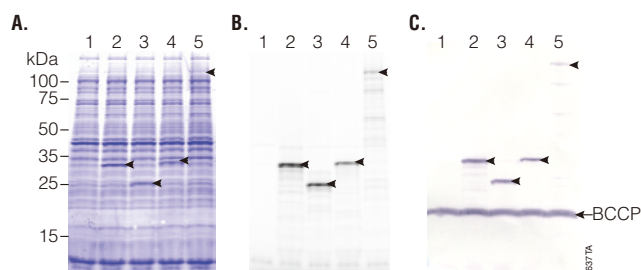
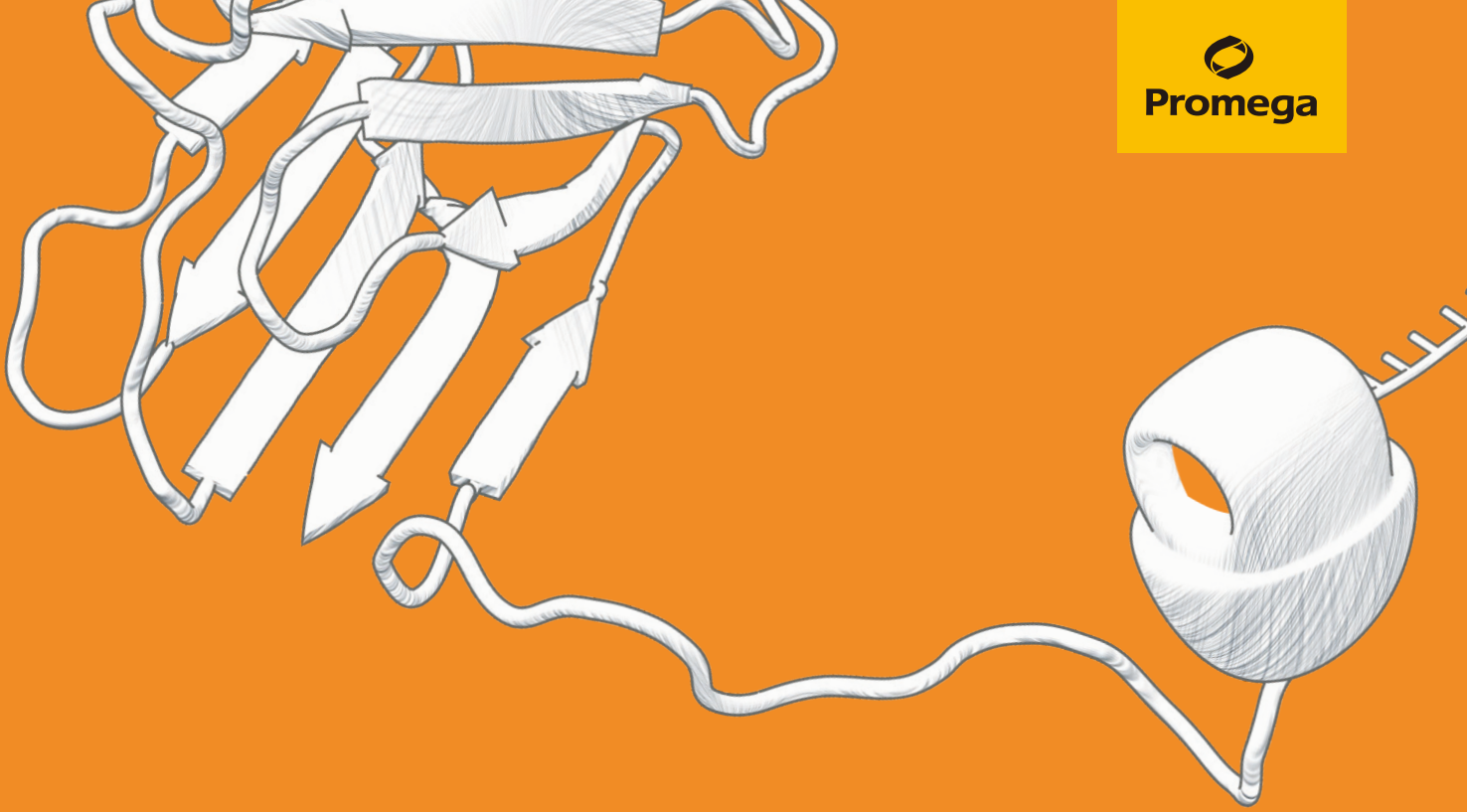


图 15. 使用 S30 T7 高产率蛋白质表达系统对环状 DNA 模板进行体外转录 / 翻译偶联。蛋白质编码序列克隆到 pFN6A (HQ) Flexi[®] 载体中表达, 如 S30 T7 高产率蛋白质表达系统技术手册 #TM306 中所述, 通过 SDS-PAGE (4–20% Tris 甘氨酸) 解析, 并通过考马斯亮蓝染色 (图 A)、荧光扫描 (图 B) 可视化, 或转移到 PVDF 膜上, 用链霉亲和素碱性磷酸酶 (Cat.#V5591) 处理, 并用碱性磷酸酶的 Western Blue[®] 稳定底物 (Cat.#S3841; 图 C) 染色。对于每个凝胶: Lane 1, 无 DNA; Lane 2, 海肾萤光素酶; Lane 3, Monster Green[®] 荧光蛋白; Lane 4, HaloTag[®] 蛋白; Lane 5, α -半乳糖苷酶 (BCCP= 大肠杆菌生物素羧基载体蛋白)。

订购信息

产品	规格	目录号
S30 T7 High-Yield Protein Expression System	24 reactions	L1110
	8 reactions	L1115

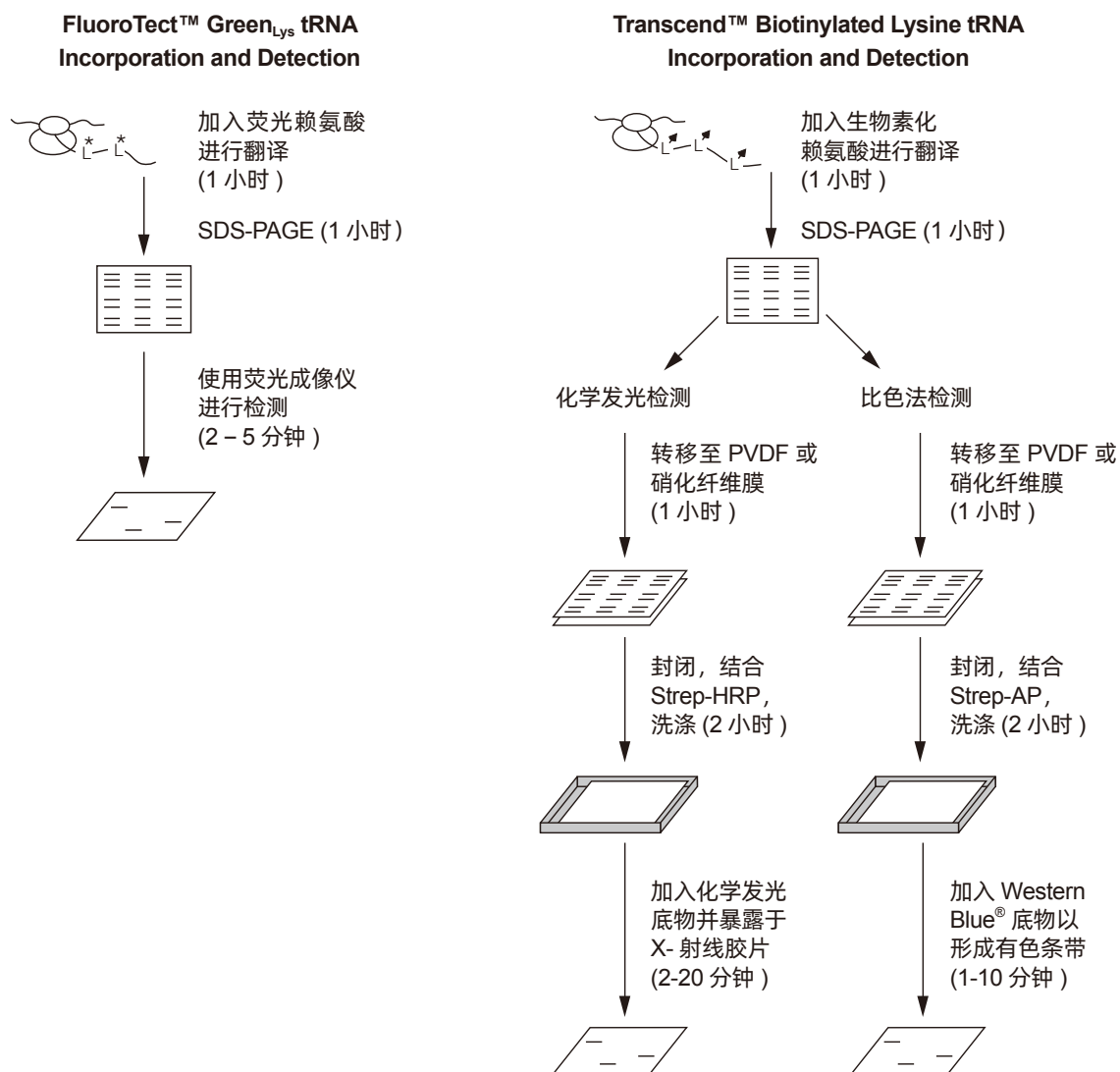


无细胞蛋白标记试剂

Cell-Free Protein Labeling Reagents

使用无细胞系统对表达的蛋白质进行标记和检测对于大多数应用都是必要的，例如蛋白质：蛋白质相互作用和蛋白质：核酸相互作用研究。开发 FluoroTect™ 检测和 Transcend™ 检测系统，可用于无细胞蛋白质合成期间非放射性蛋白质标记。这两种标记产物都基于将标记的赖氨酸残基掺入到多肽链中。标记的蛋白质产物可以通过 SDS-PAGE 后的荧光成像轻松检测到，或是使用链霉亲和素与辣根过氧化物酶（Strep-HRP）或碱性磷酸酶（Strep-AP）形成的缀合物进行 western blotting 检测。

图 16. 使用 FluoroTect™ Green_{Lys} tRNA 和 Transcend™ tRNA 的检测流程。



0878MD10_0A

FluoroTect™ Green_{Lys} in vitro Translation Labeling System

体外合成蛋白的标记和检测。

描述

FluoroTect™ Green_{Lys} in vitro Translation Labeling System 可对体外合成的蛋白进行荧光标记和检测。该系统基于负载赖氨酸的 tRNA，在赖氨酸的 ϵ 位置用荧光基团 BODIPY®-FL 对其进行相应标记。在体外翻译反应过程中，荧光赖氨酸残基将被掺入合成的蛋白质中，因此无需对其进行放射性标记。

反应原理

可通过使用荧光凝胶扫描仪，仅需 2~5 分钟就能在“凝胶内”直接对标记的蛋白进行检测。这意味着无需对蛋白质凝胶进行任何操作，例如固定 / 干燥或任何与使用放射性标记氨基酸相关的安全、法规或废物处置问题。“凝胶内”检测也更为方便快捷，避免了传统非同位素系统费时费力的电印迹和检测步骤。

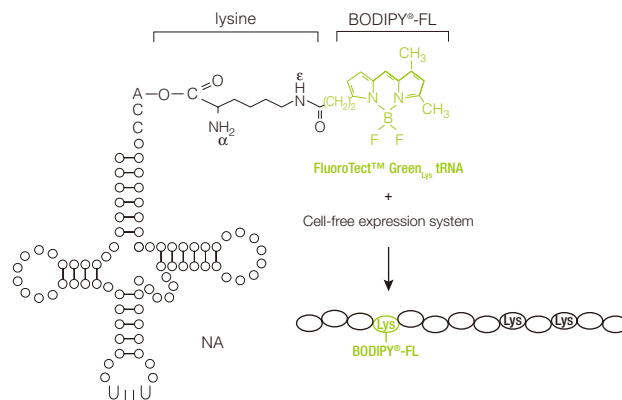


图 17. FluoroTect™ 绿色荧光标记的赖氨酸加入到新生蛋白质的示意图。

功能和优点

- **快速：**几分钟内就可以获得数据。无需转移、固定和干燥凝胶。
- **非放射性：**无与放射性相关的安全、监管或废物处置问题。
- **灵活：**修饰过的负载 tRNA 可用于多种无细胞表达系统，包括：
Rabbit Reticulocyte Lysate, TNT® Coupled Transcription/ Translation System, Wheat Germ Extract and *E. coli* S30 Extract。

订购信息

产品	规格	目录号
FluoroTect™ Green _{Lys} in vitro Translation Labeling System	40 reactions	L5001

Transcend™ Nonradioactive Translation Detection Systems

体外合成蛋白的标记和检测。

描述

Transcend™ Nonradioactive Translation Detection Systems 可实现对体外合成的蛋白质进行非放射性检测。使用该系统，可在翻译过程期间将生物素化赖氨酸残基掺入至新生蛋白质中，从而避免了利用 [³⁵S] 甲硫氨酸或其他放射性氨基酸进行标记的需要。

反应原理

该生物素化赖氨酸以预先负载的 ε 标记生物素化赖氨酸-tRNA 复合物 (Transcend™ tRNA) 的形式添加至翻译反应中，而不是游离氨基酸。在进行 SDS-PAGE 和印迹后，生物素化的蛋白质可通过与链霉亲和素-碱性磷酸酶 (Streptavidin-AP) 或链霉亲和素-辣根过氧化物酶 (Streptavidin-HRP) 结合，然后再通过比色或化学发光检测方法进行观察。通常情况下，可在凝胶电泳后 3~4 小时内使用这些方法对 0.5~5ng 的蛋白进行检测。其灵敏度与掺入 [³⁵S] 甲硫氨酸和凝胶电泳后进行放射自显影检测 6~12 小时内所得到的灵敏度相同。

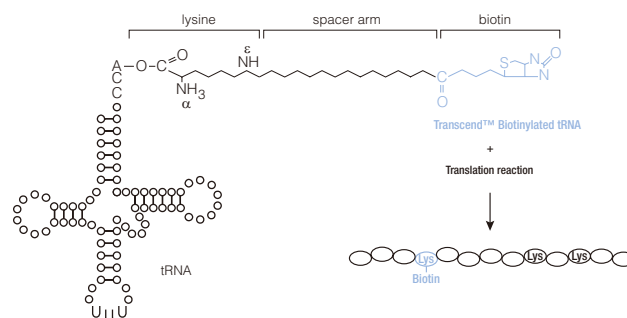


图 18. Transcend™ 标记的赖氨酸加入到新生蛋白质的示意图。

功能和优点

- **灵敏：**生物素标签可以检测 0.5–5ng 的翻译蛋白。
- **安全：**无需处理、储存或处置放射性同位素。
- **灵活：**可通过比色法或化学发光法观察结果。

订购信息

产品	规格	目录号
Transcend Colorimetric Non-Radioactive Translation Detection System	30 reactions	L5070
Transcend™ tRNA	30µl	L5061

技术应用 Applications



1. 表征 src 家族激酶的磷酸化状态和激酶活性

文献: Characterization of Phosphorylation Status and Kinase Activity of Src Family Kinases Expressed in Cell-Based and Cell-Free Protein Expression Systems. *Biomolecules*, 2021

研究目的: 异源蛋白的产生是生物学家在基础科学和应用科学中的一个重要过程。多种基于细胞和无细胞的蛋白质表达系统可用于实现这一目标。必须仔细选择表达系统, 特别是对于需要翻译后修饰的靶蛋白。在这项研究中, 使用 6 种不同的蛋白质表达系统制备人类 Src 家族激酶: 293 人类胚胎肾细胞, 大肠埃希菌和来自兔网织红细胞、小麦胚芽、昆虫细胞或大肠杆菌的无细胞表达系统。通过 Phos-tag SDS-PAGE 分析各激酶的磷酸化状态。并对其激酶活性进行了研究。

应用产品: TNT SP6 Quick Coupled Transcription/Translation System; TNT T7 Insect Cell Extract Protein Expression System; TNT SP6 High-Yield Wheat Germ Protein Expression System; S30 T7 High-Yield Protein Expression System

实验结论: 在真核生物系统中, 观察到表达的激酶有多种磷酸化形式。在兔网织红细胞裂解系统和 293 细胞中, 观察到野生型和激酶死亡突变体之间磷酸化状态的差异。表达的激酶是否活跃取决于激酶和每个表达系统的性质。在原核系统中, Src 和 Hck 以自磷酸化的活性形式表达。蛋白质表达系统之间的翻译后磷酸化有明显差异。这些结果为制备磷酸化调节的功能蛋白提供了有用的信息。

2. 原核生物分裂机制的无细胞生物学发生

文献: Cell-free biogenesis of bacterial division proto-rings that can constrict liposomes. *Communications biology*, 2020

研究目的: 实现自主合成细胞的主要挑战在于对遗传程序中的分裂机制进行编码。在细菌细胞周期中, 细胞骨架蛋白组装成一个环, 定义分裂位点。在大肠杆菌分裂形成的开始, 一个由 FtsZ 及其膜募集蛋白组成的原环发生。在这里, 我们发现由无细胞基因表达驱动的 FtsA-FtsZ 环状结构可以在平面膜上和脂质体腔室内重建。文中通过 FluoroTect™ GreenLys in vitro Translation Labeling System 对无细胞表达蛋白进行标记, 可以简单快速检测两种蛋白间相互作用。

应用产品: FluoroTect™ Green_{Lys} in vitro Translation Labeling System

实验结论: 研究结果表明, 基因导向的蛋白质合成和膜收缩 FtsZ 环的组装可以在基于脂质体的人造细胞中结合。

3. 无细胞蛋白合成方法的可变性研究

文献: Methods to reduce variability in *E. Coli*-based cell-free protein expression experiments. *Synth Syst Biotechnol*, 2019

研究目的: 无细胞蛋白合成 (CFPS) 是一种成熟的生物技术工具, 在许多应用方面均显示出极大的实用性, 如原型蛋白质, 构建遗传电路, 设计生物传感器, 表达细胞毒性蛋白。尽管 CFPS 已被广泛利用, 但文献中提出的许多不同的方法对于新用户来说可能仍具有挑战性。根据经验, 将 CFPS 应用于实验室的难点之一可能是在实验重复中存在很大程度的可变性。本文提供了 CFPS 方法的回顾性总结, 能够显著降低变异性。其中 Promega 的 S30 T7 High-Yield Protein Expression System 作为一种商用试剂盒, 用于对这些方法进行基准测试。

应用产品: S30 T7 High-Yield Protein Expression System

实验结论: 使用的 CFPS 方法包括优化提取物制备, 充分溶解反应混合物组分, 以及仔细混合反应体系。这使得变异系数从 97.3% 降低到 1.2%。此外, 这些方法可为完全的新手提供与有经验的用户相当的实验数据。

4. 生物制品的自动化生产

文献: Digital-to-biological converter for on-demand production of biologics. *Nature Biotechnology*, 2017

研究目的: 本文报告了一种数字 - 生物转换器 (DBC) 的开发, 用于从 DNA 序列信息开始的全自动、多功能和基于需求的功能性生物制品生产。具体来说, DNA 模板、RNA 分子、蛋白质和病毒颗粒均可在没有人为干预的情况下, 从数字传输的 DNA 序列中自动产生。使用 *E. coli* S30 Extract System for Linear Templates 对 DBC 上通过体外转录和翻译生成蛋白的方法进行条件优化, 以及用于产生构成抗体的多肽, 通过 FluoroTect Green_{Lys} in vitro Translation Labeling System 检测多肽。

应用产品: *E. coli* S30 Extract System for Linear Templates; FluoroTect Green_{Lys} in vitro Translation Labeling System

5. 天然内质网蛋白易位子研究

文献：Structure of the mammalian oligosaccharyl-transferase complex in the native ER protein translocon. *Nature Communication*, 2014

研究目的：在哺乳动物细胞中，蛋白质通常通过 ER 蛋白易位子以共翻译模式在内质网（ER）膜上易位，该易位子包括蛋白质传导通道 Sec61 和参与新生链加工和易位的其他复合物。作为易位子的组成部分，寡糖转移酶复合物（OST）催化共翻译 N-糖基化，这是真核细胞中最常见的蛋白质修饰之一。在这里，作者使用冷冻电子断层扫描，冷冻电子显微镜单颗粒分析和小干扰 RNA 介导的基因沉默来确定 OST 在哺乳动物细胞天然 ER 蛋白易位子中的整体结构、寡聚状态和位置。文中使用 Flexi[®] Rabbit Reticulocyte Lysate System 进行无细胞反应，分析微粒体形成后蛋白的易位情况。使用 Transcend[™] tRNA 可以在 SDS-PAGE 和 Western blotting 中直观的进行样本分析。

应用产品：Flexi[®] Rabbit Reticulocyte Lysate System; Transcend[™] tRNA

实验结论：本文观察到的 OST 在 Sec61 附近的定位为理解蛋白质易位到 ER 和新生蛋白质的糖基化如何在结构上偶联提供了基础。此处确定的原生易位子的整体空间组织是进一步假设驱动研究的可靠框架。

6. 蛋白：蛋白相互作用研究

文献：An efficient way of studying protein-protein interactions involving HIF- α , c-Myc, and Sp1. *Methods Mol Biol*, 2013

研究目的：蛋白质 - 蛋白质相互作用是介导多种细胞过程的重要生化事件，包括基因表达、细胞内信号传递和细胞间相互作用。理解这种相互作用是阐明生物学和疾病中的细胞过程机制的关键。缺氧诱导的转录因子 HIF-1 α 具有与 c-Myc 竞争 Sp1 结合的非转录活性，而其亚型 HIF-2 α 由于磷酸化而缺乏 Sp1 结合活性。本文描述了体外翻译系统的使用，以有效地研究 HIF-1 α 、c-Myc 和 Sp1 之间蛋白质 - 蛋白质相互作用的动态，并证明蛋白质磷酸化作为功能上区分 HIF-2 α 和 HIF-1 α 的分子决定因素。

应用产品：TNT[®] Rabbit Reticulocyte Lysate System ; TNT[®] Wheat Germ Extract

7. 哺乳动物嗅觉受体的无细胞表达

文献：Cell-free expression of a mammalian olfactory receptor and unidirectional insertion into small unilamellar vesicles (SUVs). *Biochimie*, 2013

研究目的：尽管编码哺乳动物嗅觉受体的多基因家族的鉴定早在 20 多年前就被发现了，但由于这些受体在异源细胞系统中的功能表达困难，我们远未了解嗅觉感知。无细胞（CF）或体外表达系统为基于细胞的蛋白质表达提供了一种巧妙的替代途径，因为膜蛋白的功能表达可以直接从基因模板实现，而无需细胞培养和蛋白质分离。依赖于不同的实验条件，例如探测无细胞表达系统的不同来源（从细菌，植物和昆虫到哺乳动物系统）和各自提取物的脂质组成，详细研究了嗅觉受体 OR5 的无细胞表达和膜插入。

应用产品：TNT[®] Quick Coupled Transcription/Translation System; *E. coli* S30 T7 High Yield Protein Expression System;

TNT[®] T7/SP6 coupled wheat germ extract

实验结论：本文呢通过基于 [³⁵S]-蛋氨酸的放射性标记，蛋白水解消化，提供了大量的生化指标。同时作者也发现将嗅觉受体 OR5 插入脂质体中会导致单向定向，结合侧暴露在水空间中，类似于嗅神经元纤毛中的天然定向。本文报告了所采用的不同体外系统的合成能力的不同结果，希望展示第一个体外试剂盒，用于非原位和离体气味受体阵列研究。

Cell-free Protein Expression



关注 Promega 微信公众号



价格查询



中文说明书



实验工具



技术资料



市场活动



经销商信息

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司
Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd

地址: 北京市东城区北三环东路 36 号环球贸易中心 B 座 907-909

电话: 010-58256268

网址: www.promega.com

技术支持电话: 400 810 8133

技术支持邮箱: chinatechserv@promega.com

印刷时间: 2023.4