

产品目录号:

L1170, L1171
L5620, L5610
L5070

T_NT[®]快速耦联转录/翻译系统

综合简明操作步骤



注意: 这是节选操作步骤, 详细英文说明书见 L1170, L1171: <http://www.promega.com/tbs/tm045/tm045.html>, L5620: <http://www.promega.com/tbs/tb305/tb305.html>, L5610: <http://www.promega.com/tbs/tb304/tb304.html>, L5070: <http://www.promega.com/tbs/tb182/tb182.html>。本中文简明操作步骤电子版见 www.promega.com.cn

本操作步骤使用的试剂盒有:

L1170, L1171: T_NT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation System

L5620: pCMV T_NT[™] Vector

L5610: pT_NT[™] Vector

L5070: Transcend[™] Colorimetric Non-Radioactive Translation Detection System

I. 实验前的准备

实验前需要准备的材料

1. 模板载体:

下列三种任选其一:

- 1) 在 pTnT[™] Vector (目录号 L5620) 中克隆有要表达的基因的载体;
- 2) 在 pCMVTnT[™] (目录号 L5620) 中克隆有要表达的基因的载体;
- 3) 自己的载体 (注 1)。

注1. 要表达的基因上游必须有 T7 RNA 聚合酶启动子序列, 避免 5' UTR 区形成发夹二级结构, 具有 Poly(A) 尾的基因翻译效率较高。注意 T7 RNA 聚合酶和要表达基因的起始密码子碱基序列之间不要有多余的起始密码子 (AUG)。要表达的基因序列应以起始密码子开头, 以终止密码子结尾。

2. 转录/翻译试剂盒

目录号 L1170 (或 L1171) TnT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation System

组分:

8x200µl	L520A	TNT [®] T7 Quick Master Mix
1x100µl	L216A	T7 TNT [®] PCR Enhancer
1x50µl	L118A	Methionine
1x5µg	L482A	Luciferase T7 Control DNA
1x250µl	L486A	Luciferase Assay Reagent
1x1.25ml	P119A	Nuclease-Free Water

3. 氨基酸标记试剂盒

目录号 L5070 Transcend[™] Colorimetric Non-Radioactive Translation Detection System

组分:

1x30µl	L506A	Transcend [™] tRNA
1x36µl	V559B	Streptavidin Alkaline Phosphatase
1x35ml	S384C	Western Blue [®] Stabilized Substrate

4. 蛋白胶 自配的 SDS-PAGE 或 Pre-Cast 胶

5. 预染蛋白质 Marker 或用生物素标记的蛋白 Marker (Bio-Rad, 目录号#161-0319)
6. 37°C, 70°C 孵育设备
7. 蛋白凝胶电泳仪器
8. PVDF 或硝酸纤维素膜
9. 电转膜装置
10. 硝酸纤维素膜或 PVDF 膜 (与蛋白胶大小相当)
11. 面积比膜略大的浅盘一个。杂交, 染色, 洗膜的浅盘 (可能用培养皿)。
12. 摇板机
13. 克隆所需试剂 (准备模板用, 如限制性内切酶, 连接酶, *E.coli* 感受态细胞, DNA 片段纯化试剂盒, LB 氨卡平板, 筛选菌落的一般性质粒提取试剂盒或自配质粒提取试剂, 等等)
14. 干净的量筒, 大试管, 小烧杯等。
15. 目录号 A1221 PureYield™ Plasmid Miniprep System 用于纯化 TnT 反应的质粒模板。

需要配制的缓冲液

蛋白凝胶电泳

13. 丙烯酰胺溶液 (acrylamide solution), 30% (37.5:1)
 - 30g acrylamide
 - 0.8g bisacrylamide
 - 加水到终体积100ml。存于4° C。

14. 固定液

- 50% 甲醇
- 10% 冰醋酸
- 40% 水

15. 1X SDS 蛋白上样液
 - 50mM Tris-HCl (pH 6.8)
 - 100mM 二硫苏糖醇 (dithiothreitol, D T T)
 - 2% SDS
 - 0.1% 溴酚蓝
 - 10% 甘油

缺 D T T 的1X SDS 蛋白上样液可在室温储存。DTT仅在使用前从 1 M DTT 储存母液中加入。

16. SDS 聚丙烯酰胺 10X 电泳缓冲液。
 - 30g Tris base
 - 144g 氨基乙酸 (glycine)
 - 100ml 10% SDS
 - 加去离子水至终体积为1升。存于室温。

17. 分离胶 4X 缓冲液

- 17g Tris base
- 4ml 10% SDS
- 加去离子水到大约 80ml。用12N HCl 调pH 8.8, 加入去离子水到终体积100ml。18-22°C储存。

18. 浓缩胶 4X 缓冲液

- 6.06g Tris base
- 4ml 10% SDS
- 加去离子水到大约 80ml。用12N HCl 调pH 6.8, 加入去离子水到终体积100ml。18-22°C储存。

显色

19. Tris-buffered saline (TBS)
 - 20mM Tris-HCl (pH 7.5)
 - 150mM NaCl



T_NT[®] 快速耦联转录/翻译系统综合简明操作步骤

20. TBS + 0.5% Tween[®] 20 (TBST)

20mM Tris-HCl (pH 7.5)

150mM NaCl

0.5% Tween[®] 20

21. 无核酸酶的水

本实验主要涉及以下三种分子生物学实验操作技术:

1. **克隆** 这是准备 TnT 模板需要进行的实验。简单的途径是用 Promega 的 pTnT[™] 或 pCMVTnT[™] 载体。只要把从 AUG 开始所要表达的基因的读码框序列(包括 ATG)插入载体的多克隆位点就可以了。这两个载体的多克隆位点的上游都有 T7 启动子和核糖体结合区, 即转录起始和翻译起始的序列都具备了。
2. **生物素标记和孵育**。这是进行主体转录/翻译的过程, 操作最简单。只要按照配方一个一个往小离心管中用移液枪准确加入试剂就行了。
3. **Western Blot**。涉及蛋白凝胶电泳, 电转膜, 显色检测。这是为了“看到”翻译后的蛋白质产物。

II. 制备转录/翻译的模板

1. **准备要表达的基因片段** 要表达的基因应该是一段以 ATG 开头, 以 UAA 结尾的读码框。这段 DNA 序列可以来自其他质粒的酶切产物, 也可以来自 PCR 产物。

有报道称用兔网织红细胞耦联的转录/翻译系统表达的最大蛋白质是 210KD (Wellington *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 9158-67)。当然表达这么大的蛋白质其反应条件经过了很多优化。

2. **准备载体** 将 pTnT 或 pCMVTnT 载体用适当的限制性内切酶消化, 纯化。

3. **连接读码框和载体, 转化 *E. coli* 感受态细胞, 挑选正确克隆**。纯化正确的质粒做模板。注意, 根据 Promega 的经验, 用目录号 A1221, PureYield[™] Plasmid Miniprep System 纯化的质粒做转录、翻译的模板得到的蛋白产率最高。

III. 转录/翻译 耦联反应

除了转录/翻译反应的孵育过程, 所有 T_NT[®] Quick Master Mix 的操作都应在 4°C 或冰上进行。没有用完的 Master Mix 应该在融后尽快冷冻以减少翻译活性损失。Master Mix 不要冻融超过 2 次。

1. 从 -70°C 取出 T_NT[®] Quick Coupled Transcription/Translat System (目录号 L1170, L1171) 试剂盒。用手的温度快速融化本次要用的 T_NT[®] Quick Master Mix 然后置于冰上。其它组分可以在室温融化, 然后置于冰上。

2. 按照下列例子, 在 0.5ml 或 1.5ml 小离心管中装配反应混合物, 加完所有组分后, 用移液枪上下吹吸混匀, 可以短暂离心使液体集中在离心管底部。

3. 建议做一个不加 DNA 模板的阴性对照。这个阴性对照反应可以测标记赖氨酸的量背景掺入量。



T_NT[®] 快速耦联转录/翻译系统综合简明操作步骤

用质粒 DNA 进行 TNT[®] Quick 反应举例 (以 Transcend[™] tRNA 标记):

组分	阳性对照	实验组	阴性对照
T _N T [®] Quick Master Mix	40ul	40ul	40 ul
Methionine 1mM (使用前轻轻混匀)	1ul	1ul	1 ul
DNA 模板	luciferase control DNA T7 2ul	质粒 DNA 模板 2ul (0.5 ug/ul)	0
Transcend [™] Biotin-Lysyl-tRNA	2 或 0	1-2 ul	2 ul
无核酸酶的水	5 或 7ul	5-6 ul	7 ul
终体积	50 ul	50 ul	50 ul

注意: 按比例减少各组分体积可以进行较小体系的反应。

4. 在 30°C 反应 60-90min。

IV 蛋白质凝胶电泳分析翻译产物

翻译产物的分子量可以用蛋白质预染 Marker 或生物素标记的蛋白 Marker (Bio-Rad, 目录号#161-0319) 来确定。

1. 50ul 翻译反应完成后, 取出 1-5 ul 加到 20 ul 的 SDS 上样缓冲液中。剩下的翻译产物可以存放在 -20°C 或 -70 °C。

2. 盖上试管盖, 100°C 孵育 2 分钟使蛋白变性。也可以做 60°C, 20 分钟、70°C, 10 分钟或 80-85°C, 3-4 分钟。

3. 将 5-10 ul 变性蛋白质加到 SDS 聚丙烯酰胺凝胶孔中或存于 -20°C。

4. 用电泳设备标准条件电泳, 一般浓缩胶用电流 15 mA, 分离胶用 30mA。电泳到溴酚兰带到凝胶底部。

V 电转膜

按照转膜装置的说明书操作, 一般小胶电转移用

100 V, 60 分钟, 或用半干系统 15 分钟, PVDF 膜在放进转移缓冲液之前要在甲醇中预湿。

VI 显色

以下任何步骤中都不能让膜干掉, 洗涤和孵育过程在室温操作。用一个比胶略大的浅盘(如培养皿)。

在 Streptavidin-AP 孵育和显色反应中, 溶液用量要刚好浸没膜。一般说, 0.24 ml/cm² 膜的量正好。(即 7×9 cm 膜用 15 ml)。杂交和洗涤步骤中用的液体量是上述量的两倍。

注意:

1. 所有步骤在室温进行
2. 操作膜时请带手套, 在步骤之间不要让膜干掉。
3. 蛋白质转到 PVDF 膜之后, 可以干燥保存。在杂交之前, PVDF 膜必须用 100% 甲醇再浸湿并用去离子水洗两遍。



操作步骤:

1. **封膜。**将 7x9 cm 膜放进比它略大的浅盘中，向浅盘中加入 15 ml TBST，室温孵育 60 min。

如果膜的大小不是 7X9cm, 要调整浅盘大小和加入的 TBST 量。

2. **结合 Streptavidin-AP。**仅在使用前，在一个大于 15ml 的试管或小烧杯中加入 6ul 的 Streptavidin-AP, 再加入 15 ml 新鲜配置的 TBST (即稀释 Streptavidin-AP)。把第 1 步中的 TBST 倒掉，把这个 Streptavidin-AP 溶液加到膜上，振摇 45-60 分钟。

3. 倒掉 Streptavidin-AP 溶液，用 15 ml TBST 洗 1 分钟，共洗 2 次，每次 1 分钟。再用水洗 1 分钟，共洗 2 次。

4. **显色。**将膜浸在 Western Blue[®] Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase (或另外的 BCIP/NBT 试剂) 中，直到表达的蛋白条带显出的颜色足够深。一块 7×9 cm 膜大约需要 5ml 底物溶液。注意溶液要避强光。反应区域一般在 1-15 分钟内颜色会变紫。

5. 颜色显现到想要的深度后，把膜转到装去离子水中的浅盘中洗几分钟以终止反应。换干净水再洗一次。

6. 在空气中把膜晾干。长期保存膜要避光。

VII. 阳性对照萤光素酶检测

发光强度是萤光素酶催化速率的测量指标，因此与反应温度关系密切。萤光素酶活性的最佳温度大约是室温(20-25°C)。测量之前，**务必**把萤光素酶检测试剂完全平衡到室温。为了确保温度平衡，可将一份融解的萤光素酶检测试剂密封后放进一直放置在室温的水浴锅中，至少 30 分钟。要检测的样品也应是室温的。

萤光发光计 (Luminometer) 和液闪仪都用来定量检测萤光。光强度一般不够目测。萤光发光计可以检测到 10-20 摩尔 (0.001pg) 的萤光素酶分子，液闪仪的灵敏度要差一些。不过。灵敏度的极限取决于所使用的特定的仪器。检测应在仪器检测范围的一部分呈线性关系。操作请查看所用仪器的使用手册。

使用萤光发光计的检测步骤:

1. 在发光计检测管中加入 50ul 萤光素酶检测试剂，一份样品需一个检测管。
2. 设置萤光发光计的检测程序为 2 秒延迟，10 秒读数。如果样品发光足够多，读数时间可缩短。
3. 向装有 50ul 萤光素酶检测试剂的检测管中加入 2.5ul TnT 萤光素酶阳性对照反应液，吹吸 2-3 次或震荡混匀。
4. 将检测管放进萤光发光计，开始测量。
5. 记录读值。

VIII. 相关产品

- G7451 Anti-Luciferase pAb
- Y4041 Canine Pancreatic Microsomal Membranes