

蛋白过表达试剂盒

Protein Overexpression Kit

本产品冰袋运输,其中转染试剂、表达增强剂置于 4℃避光保存,赠品置于 -20℃保存,保质期 12 个月。

货号规格

货号	规格
ZC101	100次
ZC101L	500次(ZC101×5)

产品内容

组分名称	体积(100次)	体积(500次)	保存条件
转染试剂	0.75 mL	0.75 mL×5	4℃
表达增强剂	12 mL	12 mL×5	4℃
GFP-pcDNA3.1(参照质粒)	60 μL	60 μL×5	-20℃
MBP-pcDNA3.1(参照质粒)	60 μL	60 μL×5	-20℃
KCNQ4-pcDNA3.1(参照质粒)	60 μL	60 μL×5	-20℃
DYKDDDDK-Tag Mouse mAb, HRP Conjugated (Binds to FLAG® tag sequence)	10 μL	10 μL×5	-20℃

注：红色组分为赠品。

产品简介

雅酶蛋白过表达试剂盒(ZC101)基于一种高效的转染试剂,配合使用表达增强剂,可将携带目的基因的质粒转染至真核细胞内并高效表达。本试剂盒可在极少量细胞中完成蛋白过表达情况的检测,帮助操作者迅速判定所构建的基因在细胞系中的表达情况。

根据表达蛋白在细胞内的分布类型,本试剂盒提供了三种可作为转染阳性参照的质粒(均以 pcDNA3.1 为载体, Amp 抗性),可分别在哺乳动物细胞系中过表达胞内蛋白 GFP(32 kDa),分泌蛋白 MBP(45 kDa)和跨膜蛋白 KCNQ4(82 kDa)。三种质粒均为无内毒素质粒,浓度均为 200 ng/μL,可直接用于细胞转染,也可作为模板进行目的基因的构建。三种质粒的蛋白基因上均含有 His/Strep/Flag/HA 四种常见的标签蛋白基因,便于操作者采用与之适配的标签抗体进行 Western Blot 检测。

此外,本试剂盒额外提供 HRP 偶联的 DYKDDDDK-tag 抗体(直标抗体),无需使用二抗,经 1:10,000 稀释后可直接用于阳性参照蛋白和含有 Flag-tag 目的蛋白的 Western Blot 检测。

产品特点

- 转染效率高** — 可在含血清与抗生素的完全培养基中转染,在有血清的条件下均可发挥作用;
- 细胞毒性低** — 独特的组合配方最大程度减少对细胞的损伤,保持细胞活性;
- 适用范围广** — 适用于大多数常见的哺乳动物细胞系的 DNA 转染,如悬浮细胞(CHO-S、Expi293F、HEK293F、HEK293S 等),贴壁细胞(HEK293T、Hela、NIH/3T3、MCF-7、CHO-K1、Hep G2、COS-1、COS-7 等);
- 适配性强** — 无需使用特定培养基稀释转染试剂,使用培养细胞所用的同种培养基(不加血清)即可;
- 操作便捷** — 操作方法与传统转染方法一致,且细胞转染后无需换液,只需添加表达增强剂即可。

必需的额外材料

细胞培养板(贴壁细胞); 25 mL 规格细胞培养瓶(悬浮细胞)。

注意事项

1. 转染所用质粒应为无内毒素质粒,未去除内毒素的质粒对细胞损伤较大;
2. 参照质粒表达的 KCNQ4 为四聚体蛋白,单体大小为 82.3 kDa,在一些细胞系中表达后的 WB 结果会有多聚体条带;
3. 不同细胞系对表达增强剂的敏感性不同,若细胞转染后状态不佳,可将表达增强剂的比例由 6% 降为 3%;
4. 若采用12孔板或24孔板进行细胞转染,本试剂盒分别可使用200次或400次,每孔试剂用量如下:

	细胞体积	接种密度	转染试剂/无血清培养基	质粒用量/无血清培养基	表达增强剂
12孔板	1 mL	约 0.25×10^6 个/mL	3.6 μ L/50 μ L	1.2 μ g/50 μ L	60 μ L
24孔板	0.5 mL	约 0.25×10^6 个/mL	1.8 μ L/25 μ L	0.6 μ g/25 μ L	30 μ L

使用说明

1. 按下表提前准备细胞。对于贴壁细胞(以6孔板为例),根据细胞的生长情况,提前一天使用胰酶消化处理后铺板,确保转染当日细胞总数量为 1×10^6 个/孔,或者细胞长满80%以上区域即可;

	准备时间	耗材	细胞体积	接种密度
贴壁细胞	转染前24 h	6孔板	2 mL/孔	约 0.25×10^6 个/mL
悬浮细胞	转染前1~2 h	25 mL培养瓶	4 mL/瓶	1×10^6 个/mL

2. 将准备好的无内毒素质粒和转染试剂分别使用与培养细胞一致的培养基(不加血清)进行稀释,静置5 min;

	用量	培养基(不加血清)用量	孵育时间
转染试剂	7.5 μ L	100 μ L	5 min
质粒	2.5 μ g	100 μ L	5 min

3. 吸取转染试剂稀释液,缓慢加入质粒稀释液中,充分混匀后静置10 min;
4. 将步骤3中的混合液缓慢地滴加在含细胞的6孔板或培养瓶中,轻轻摇晃均匀;
注意: 6孔板应轻轻“十”字摇晃,避免旋转摇晃。
5. 将细胞静置培养12~16 h后(即过夜培养),向6孔板或培养瓶中加入终浓度为6%的表达增强剂(6孔板120 μ L/孔,摇瓶240 μ L/瓶),轻轻摇晃均匀;
注意: 6孔板应轻轻“十”字摇晃,避免旋转摇晃,若所使用的细胞系对表达增强剂敏感,可降低表达增强剂的终浓度至3%。
6. 将细胞继续培养24 h;
7. 按以下步骤准备样品进行Western Blot检测:
 - ◆ 对于贴壁细胞中过表达的胞内/跨膜蛋白,可吸尽板孔中的培养基,转移至2 mL EP管中,板孔中加入裂解液于摇床中4℃裂解5~10 min,将EP管中的培养基离心收集细胞沉淀,并用少量裂解液裂解,合并两次细胞裂解液,离心(4℃,12,000 $\times$ g,3 min),取上清与上样缓冲液(货号:LT101或LT103)混和;
 - ◆ 对于悬浮细胞,可按照每100 μ L细胞沉淀加入50~100 μ L裂解液的比例处理样品。

	样品收集	裂解液用量(6孔板)	上样前处理
胞内蛋白	细胞(沉淀)	1 mL/孔	100℃ 5 min
分泌蛋白	细胞上清	-	100℃ 5 min
跨膜蛋白	细胞(沉淀)	0.5 mL/孔	不加热

注: 裂解液可选用雅酶的RIPA裂解液或相应蛋白提取试剂盒。