

无细胞蛋白合成试剂盒 技术手册

202604 V1.0

目录

1 产品信息	4
1.1 试剂盒规格	4
1.2 试剂盒组成	4
1.3 分装方法	4
1.4 注意事项	4
2 无细胞蛋白表达	5
2.1 无细胞蛋白表达概述	5
2.2 无细胞表达的实验流程	5
3 模板 DNA 的制备	6
3.1 目的基因的设计	6
3.1.1 密码子优化	6
3.1.2 标签	6
3.2 目的基因上下游的序列要求	6
3.3 DNA 模板形式	6
3.4 模板 DNA 的溶液要求	7
3.5 环状 DNA 模板——质粒	7
3.5.1 质粒载体要求	7
3.5.2 示例：使用酶切连接方式构建质粒	8
3.5.3 示例：使用无缝克隆方式构建质粒	9
3.6 线性 DNA 模板——PCR 产物	11
3.6.1 PCR 产物的制备	11
3.6.2 示例：一步 PCR 从 pET 系列载体扩增得到线性 DNA 模板的操作方法	12
3.7 RCA 产物——phi29 扩增产物	13
3.7.1 RCA 制备模板 DNA 的操作概述	13
3.7.2 RCA 制备模板 DNA 的操作示例	14

4 无细胞反应	15
4.1 无细胞胞体系配制	15
4.2 DNA 模板的添加量要求	15
4.2.1 质粒	15
4.2.2 线性 DNA	15
4.2.3 RCA 产物	15
4.3 无细胞反应容器及设备的选择	16
4.4 无细胞反应温度和时间	16
5 无细胞表达产物检测	16
5.1 SDS-PAGE	16
5.2 其他检测方法	17
6 无细胞表达产物纯化	18
7 无细胞表达实例	19
7.1 常规蛋白	19
7.1.1 绿色荧光蛋白 sfGFP 和红色荧光蛋白 mCherry	19
7.1.2 其他常规蛋白	19
7.2 含二硫键蛋白	20
7.2.1 高斯荧光素酶	20
7.2.2 纳米抗体	20
7.2.3 vtPA	21
7.2.4 Fab	21
7.3 非天然氨基酸	22
7.3.1 非天然氨基酸概述	22
7.3.2 示例：在 sfGFP 中插入 pAzF 和 pAcF	22
8 常见问题与解决方法	23
9 无细胞试剂盒相关产品信息	24

1 产品信息

1.1 试剂盒规格

产品货号	产品名称	规格	适用场景
EG24301S	<u>Cell-Free Protein</u>	可进行 1 ml 无细胞反应	常规表达体系
EG24301M	<u>Synthesis Kit</u>	可进行 5 ml 无细胞反应	
EG25301S	<u>Cell-Free Protein</u>	可进行 1 ml 无细胞反应	可促进蛋白质折叠， 提高蛋白可溶性
EG25301M	<u>Synthesis Kit Pro</u>	可进行 5 ml 无细胞反应	
EG25302S	<u>Cell-Free Protein</u>	可进行 1 ml 无细胞反应	适用于表达富含二硫 键的蛋白
EG25302M	<u>Synthesis Kit Max</u>	可进行 5 ml 无细胞反应	

1.2 试剂盒组成

试剂名称	规格 (1 ml 体系)	规格 (5 ml 体系)	说明	储存 温度
Cell-free System Solution A	300 μ l	1500 μ l	细胞裂解液	$\leq -80^{\circ}\text{C}$
Cell-free System Solution B	600 μ l	3000 μ l	含氨基酸、核苷酸、能量物质、无 机盐等	$\leq -80^{\circ}\text{C}$
Control Plasmid	2 μ g	2 μ g	质粒 pJL1-sfGFP，可作为无细胞蛋 白合成阳性对照（浓度约 100 ng/ μ l）	$\leq -20^{\circ}\text{C}$

储存条件说明：溶液 A 和溶液 B 使用后均须保存于 -80°C ，必要时进行分装，避免反复冻融。

1.3 分装方法

试剂盒于 -80°C 保存时具有良好的稳定性，反复冻融会导致活性下降。若每次使用量较少，建议将试剂分装后保存。分装小体积试剂时，建议使用低吸附管，以减少试剂损失并保证实验可靠性。

请将溶液 A 和溶液 B 冰上或 4°C 解冻，避免长时间处于解冻状态，充分混匀后分装。建议使用液氮快速冷冻，再放于 -80°C 保存。

1.4 注意事项

产品仅限专业人员进行科学研究使用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。

2 无细胞蛋白表达

2.1 无细胞蛋白表达概述

无细胞蛋白合成试剂盒（Cell-Free Protein Synthesis Kit）是一款基于大肠杆菌细胞裂解液进行体外蛋白质合成的产品。该产品利用细胞裂解液中的核糖体、翻译因子、酶等活性物质，同时补加能量、核苷酸、氨基酸、无机盐等，在体外重构转录-翻译体系，以 DNA 或 RNA 为模板，体外表达蛋白质。无细胞蛋白表达系统不依赖于活细胞，可灵活快速表达蛋白质，与传统重组表达系统相比具有众多优势：

- 蛋白表达快，1~2 h 即可表达出目的蛋白，8~24 h 基本达到最大表达水平；
- 蛋白表达量高，最高可达到 3 mg/ml 的蛋白表达量；
- 操作简单，仅需向反应体系中加入 DNA 或 RNA 模板，可于 96 孔板或离心管中反应。

2.2 无细胞表达的实验流程

利用无细胞蛋白合成试剂盒合成蛋白质的常规流程如图 2-1。请根据目的蛋白的性质选择合适的无细胞表达试剂盒。

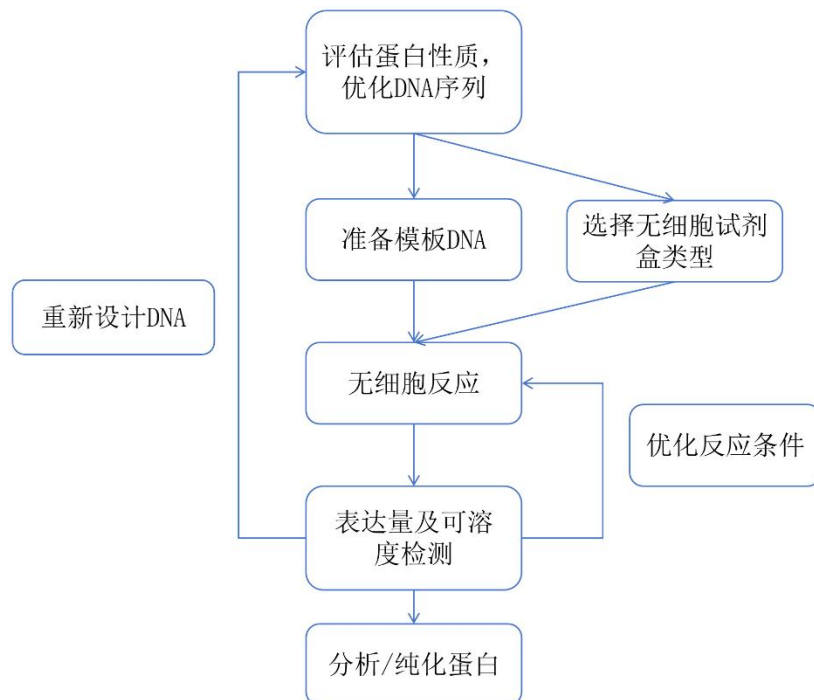


图 2-1 无细胞蛋白表达常规流程

3 模板 DNA 的制备

3.1 目的基因的设计

3.1.1 密码子优化

除蛋白本身的性质外，编码蛋白的 DNA 序列对蛋白表达量和溶解性也有重大影响。本试剂盒基于大肠杆菌，其核糖体、tRNA 和翻译因子等均来源于大肠杆菌，因此原则上需要按照大肠杆菌的密码子偏好性来优化目的基因序列。为达到良好的表达效果，建议设计多条 DNA 序列。

3.1.2 标签

蛋白 N 端序列为翻译起始部分，其序列对蛋白表达量影响较大，在蛋白的 N 端添加常用 MBP、Ub、SUMO 等标签可能有助于提高蛋白表达量。因此当蛋白表达不佳时，可以考虑在蛋白 N 端添加标签。

3.2 目的基因上下游的序列要求

目的基因的上游区域须包含 T7 启动子、核糖体结合位点等 5'UTR 序列，下游区域须包含 T7 终止子序列。

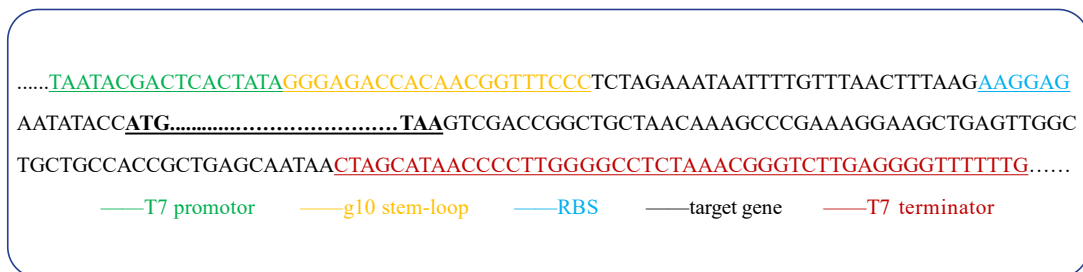


图 3-1 目的基因上下游序列示意图

3.3 DNA 模板形式

无细胞反应的 DNA 模板可以是质粒、线性 DNA 或 RCA 产物。质粒模板是所有模板中蛋白表达效率最高的、最稳定的，但其劣势在于质粒的获取需进行耗时耗力的细菌培养、质粒抽提等操作；线性 DNA 模板的表达效率一般可以达到质粒的 60%~70%，其优势在于获取方便快捷，一般通过简单的 PCR 即可获取；RCA 产物的表达效率和线性 DNA 类似，其优势在于其使用等温扩增的方式，易于大量制备 DNA 模板，适用于进行大体积无细胞反应的场景。不同 DNA 模板用于无细胞的表达结果示例如图 3-2 所示。

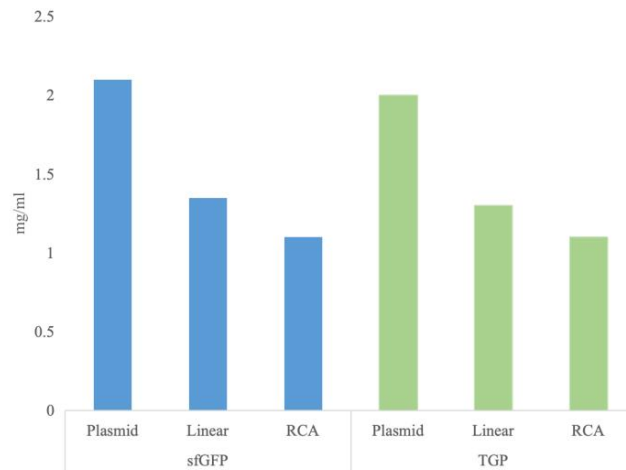


图 3-2 不同 DNA 模板的表达结果

DNA 模板有多种制备策略，客户可根据实验目的和需要以及自身实验场景情况合理选择。

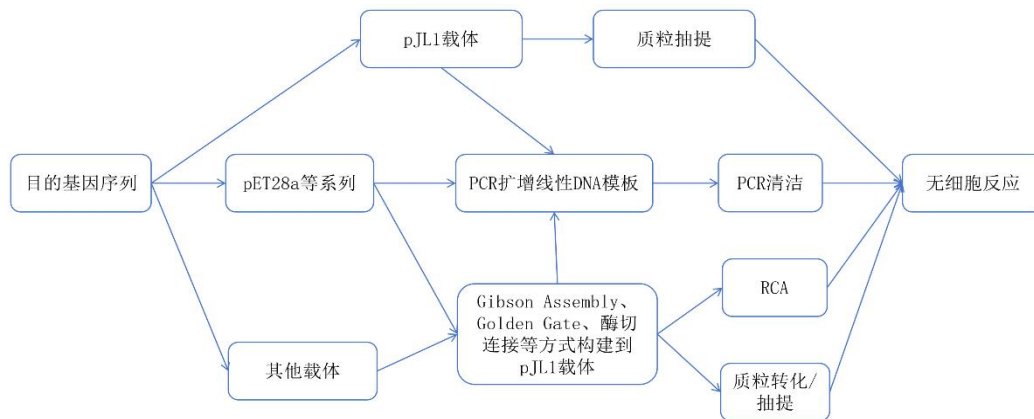


图 3-3 无细胞 DNA 模板构建和制备策略

3.4 模板 DNA 的溶液要求

TE 缓冲液中的 EDTA 会螯合转录和翻译反应所需的镁离子，从而降低蛋白合成效率。因此，建议使用 ddH₂O 溶解模板 DNA。此外，RNase 会降解反应体系中的 RNA，包括 mRNA 和 tRNA，因此实验过程中建议使用无 RNase 的水和试剂，使用洁净的实验器具，并佩戴口罩进行操作。

3.5 环状 DNA 模板——质粒

3.5.1 质粒载体要求

pET28a 等载体中含有乳糖操纵子，会极大降低蛋白质的产量，建议使用 pJL1、pET9a、pET23a 等不含乳糖操纵子序列的载体。本试剂盒提供的阳性质粒 pJL1-sfGFP（图 3-4），可以作为目的基因的克隆载体。推荐将目的基因直接合成到 pJL1 载体上，然后用于无细胞反

应。

若目的基因已经合成到其他载体上，可使用酶切连接、无缝克隆等方式将目的基因亚克隆至 pJL1 载体上。



图 3-4 阳性质粒 pJL1-sfGFP 结构及部分酶切位点示意图

3.5.2 示例：使用酶切连接方式构建质粒

3.5.2.1 酶切位点的选择

阳性质粒 pJL1-sfGFP 上含有多克隆位点，可用于将目的基因酶切连接到表达载体 pJL1 上。多克隆位点 MCS 含有的内切酶酶切位点如图 3-5 所示，详细信息参见 pJL1-sfGFP 的 DNA 序列图谱，内切酶选择时应注意在表达载体 pJL1 除开放阅读框以外的区域无酶切位点。例如可使用限制性内切酶 NcoI 和 BsrGI，将目的基因构建到 pJL1 上，替换阳性质粒已有的基因序列（使用酶切连接的克隆方式应确保目的基因序列内部不含 NcoI 和 BsrGI 酶切位点，可使用同义密码子消除这两个酶切位点，或使用无缝克隆等其他方式构建质粒）。

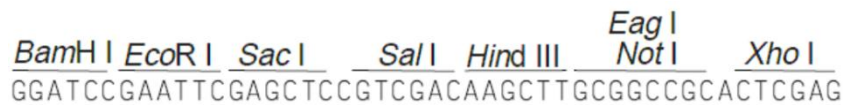


图 3-5 MCS 多克隆位点序列

3.5.2.2 酶切连接

参照限制性内切酶、连接酶的操作说明。

3.5.2.3 转化、测序与质粒抽提

参照一般的大肠杆菌转化方法，进行连接产物的转化。pJL1 载体是一个高拷贝、不含乳糖操纵子的载体，克隆时需注意避免使用 BL21(DE3) 等被 λ 噬菌体 DE3 溶原化的菌株，这些菌株存在泄漏表达而可能导致质粒突变，推荐使用 DH5α、T1、TOP10 等克隆菌株。

转化后菌落建议送测序公司对目的基因附近区域进行测序，以确保目的基因序列完全正确。测序引物可选择通用的引物对 T7/T7_ter (T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGG-3', T7_ter: 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3')。

质粒 DNA 抽提过程中残留的核酸酶会抑制蛋白质合成，因此需确保最终纯化产物中无核酸酶污染。建议使用高纯度质粒提取试剂盒抽提质粒 DNA，使用 ddH₂O 进行洗脱。如果质粒通过基因合成公司获得，需强调要使用柱纯化的方式获得，否则需自行重新提取，再进行无细胞反应。

3.5.3 示例：使用无缝克隆方式构建质粒

3.5.3.1 引物设计

使用无缝克隆将目的基因亚克隆到 pJL1 的操作示意图如 3-6 所示。

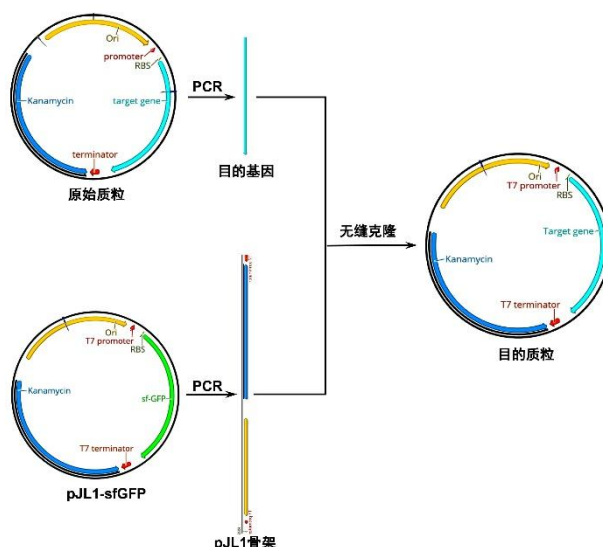


图 3-6 使用无缝克隆进行目的基因亚克隆的示意图

根据目的基因和 pJL1-sfGFP 序列设计含同源区的引物，使用高保真酶分别扩增目的基因和 pJL1 质粒，获得相应的 PCR 片段。然后使用无缝克隆将两个 PCR 片段连接为无细胞所需要的质粒。引物的设计推荐使用软件来进行，如需手动设计可参考以下两种设计方案(图 3-7)，客户可以根据目的基因的具体序列来合理调整，达到最佳的扩增和连接效果。

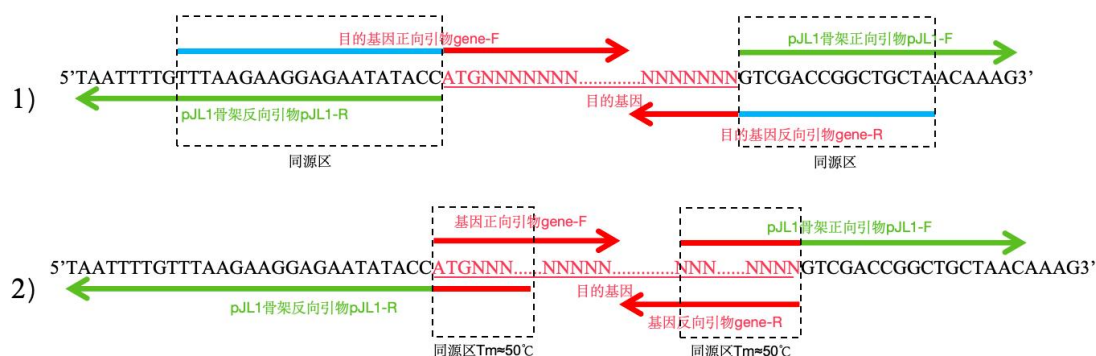


图 3-7 无缝克隆引物设计方案参考

使用引物设计方案 1，做不同基因的构建时，质粒骨架的扩增引物保持不变，只需要设计目的基因的扩增引物。当客户已有目的基因的扩增引物时，可采取引物设计方案 2。引物序列参考表 3-1。

表 3-1 引物序列

方案	目的	引物名称	序列
1	扩增目的基因	gene-F1	5'-TTAAGAAGGAGAATATACCATGNNNNNNNNNNNNNNNN-3'
		gene-R1	5'-TAGCAGCCGGTTCGACNNNNNNNNNNNNNNNN-3'
	扩增 pJL1 骨架	pJL1-F1	5'-GTCGACCGGCTGCTAACAAAG-3'
		pJL1-R1	5'-GGTATATTCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAAT-3'
2	扩增目的基因	gene-F2	5'-ATGNNNNNNNNNNNNNNNN-3'
		gene-R2	5'-NNNNNNNNNNNNNNNN-3'
	扩增 pJL1 骨架	pJL1-F2	5'-NNNNNNNNNNNNNNNGTCGACCGGCTGCTAACAAAG-3'
		pJL1-R2	5'-NNNNNNNNNNNNNCATGGTATATTCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAAT-3'

注：绿色表示序列与 pJL1 质粒骨架互补配对，红色表示序列与目的基因互补配对。

3.5.3.2 无缝克隆

推荐使用本公司的 DNA Assembly Mix Ultra 无缝克隆试剂盒，参照说明书配置如表 3-2 的反应体系。在 PCR 管中加入无缝克隆所需各试剂，混匀，50°C 孵育 15 min；瞬离，产物放 4°C 或进行下一步转化实验。

表 3-2 Gibson Assembly 反应体系

试剂	加量
DNA Assembly Mix Ultra	5 μl
基因片段	10~200 ng
载体(pJL1)片段	40 ng
ddH ₂ O	To 10 μl

注：基因片段具体加量请参照本公司产品 DNA Assembly Mix Ultra 的说明书。

3.5.3.3 转化、测序与质粒抽提

质粒的转化与抽提见 3.5.2.3。

3.6 线性 DNA 模板——PCR 产物

3.6.1 PCR 产物的制备

可使用 PCR 的方式从质粒或无缝克隆产物扩增出线性 DNA 模板，建议 T7 启动子上游和 T7 终止子下游各添加 200bp 作为保护碱基。如使用 pJL1 载体，可使用如表 3-3 所示引物。

表 3-3 引物序列

引物名称	序列
pJL1-CFE forward	5'-GGCTACCACCTGCCAGGCTATAATACGACTCACTATAGGGAGAC-3'
pJL1-CFE reverse	5'-TGGCAGGTGGTAGCCGGCTACAAAAACCCCTCAAGACCCG-3'

线性模板 DNA 的 PCR 扩增需使用高保真酶，推荐使用本公司 2× S705 HiFi Master Mix，包含 S705 High-Fidelity DNA Polymerase、dNTPs 和精心优化的反应缓冲液，只需加入模板、引物和水即可进行高保真 PCR 反应。

PCR 体系和程序如下：

表 3-4 PCR 反应体系

试剂	加量
2× S705 HiFi Master Mix	25 μl
pJL1-CFE forward(10 μM)	2 μl
pJL1-CFE reverse(10 μM)	2 μl
模板(质粒/无缝克隆产物)	2~20 ng/2 μl
ddH ₂ O	To 50 μl

按上表在 PCR 小管中加入各试剂，混匀，按照下表程序运行。

表 3-5 PCR 扩增程序

温度	时间	循环数
95°C	3 min	35 cycles
95°C	10 s	
60°C	15 s	
72°C	30 s/kb	
72°C	5 min	

PCR 反应结束后，若电泳检测出现非目标条带，需优化 PCR 反应条件以减少非特异性扩增产物。非特异性扩增产物也可能作为转录模板，进而影响目标蛋白的合成效率。若优化 PCR 反应条件后仍无法消除非特异性扩增产物，则需通过试剂盒进行胶回收纯化。切胶回收时应避免使用紫外线照射，防止造成 DNA 损伤，影响转录效率。切胶过程建议使用蓝光透射仪，且尽量缩短照射时间。

3.6.2 示例：一步 PCR 从 pET 系列载体扩增得到线性 DNA 模板的操作方法

3.6.2.1 概述

大肠杆菌重组表达常使用含乳糖操纵子的载体如 pET28a、pET32a 等，这类载体的操纵子会大幅降低无细胞表达的效率。针对这类载体，我们设计了对应的上下游引物对目的基因进行扩增以得到能直接用于无细胞反应的模板，示意图见图 3-8。其中上游引物包含了 T7 启动子、RBS 等序列，下游引物包含了 T7 Terminator，使用该引物经一步 PCR 扩增得到的线性 DNA 模板适配无细胞表达试剂盒。

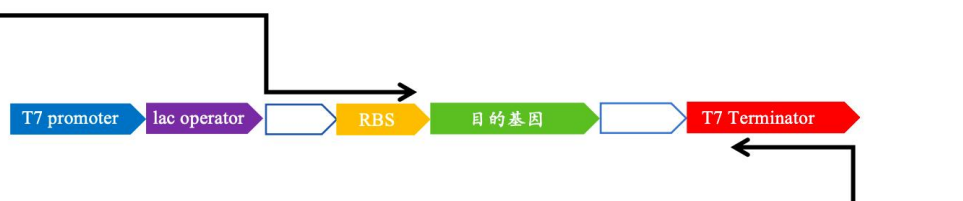


图 3-8 一步 PCR 从 pET 载体扩增得到无细胞线性 DNA 模板

引物序列如下表 3-6 所示。

表 3-6 从 pET 载体获得线性 DNA 模板的引物序列

引物名称	序列
T7Pro-SD primer forward	5'-GGCTACCACCTGCCAGGCTATAATACGACTCACTATAGGGAGAC CACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAG-3'
T7Ter primer reverse	5'-TGGCAGGTGGTAGCCGGCTACAAAAACCCCTCAAGACCCG-3'

3.6.2.2 操作步骤

PCR 体系和程序如下：

表 3-7 PCR 反应体系

试剂	加量
2× S705 HiFi Master Mix	25 μl
T7Pro-SD primer forward(10μM)	2 μl
T7Ter primer reverse(10μM)	2 μl
模板(pET 系列质粒)	2~20 ng
ddH ₂ O	To 50 μl

表 3-8 PCR 扩增程序

温度	时间	循环数
95°C	3 min	35 cycles
95°C	10 s	
55°C	15 s	
72°C	30 s/kb	
72°C	5 min	

PCR 结束后，取样 2 μl 进行琼脂糖凝胶电泳，检测目的条带扩增状况。若扩增良好可使用 PCR 产物纯化试剂盒对 PCR 产物进行纯化，放 4 $^{\circ}\text{C}$ 暂存，-20 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存。

3.7 RCA 产物——phi29 扩增产物

3.7.1 RCA 制备模板 DNA 的操作概述

滚环扩增（Rolling Circle Amplification, RCA）是一种基于环状 DNA 模板的恒温核酸扩增技术，其原理是通过短 DNA 引物与环状模板互补，在 phi29 DNA 聚合酶的催化下，稳健并高效扩增环状 DNA。phi29 DNA 聚合酶具有卓越的链置换和持续合成能力，可合成长达 70 kb 的 DNA 片段，其保真度高于目前绝大多数 DNA 聚合酶。RCA 产物已经被用于 doggybone 技术，完全规避发酵培养环节，快速制备符合 GMP 标准的 DNA 产物。

Gibson Assembly、Golden Gate 等无缝克隆技术能够以模块化的方式组装 DNA，可处理 2 个至十几个片段的无痕迹组装。使用无缝克隆将 DNA 组装成环，再通过 RCA 大量扩增，可获得适用于无细胞的大量 DNA 模板。这种方式规避了细菌培养、质粒抽提等耗时费力的工作，使得 DNA 模板构建和蛋白表达完全在体外进行。

例如首先使用 Gibson Assembly 将目的基因（一个片段或多个片段）和质粒（pJL1）骨架组装成环，然后利用 phi29 DNA 聚合酶进行 RCA 扩增。扩增产物经过检测，投入到无细胞体系进行反应，流程示意图见图 3-9。

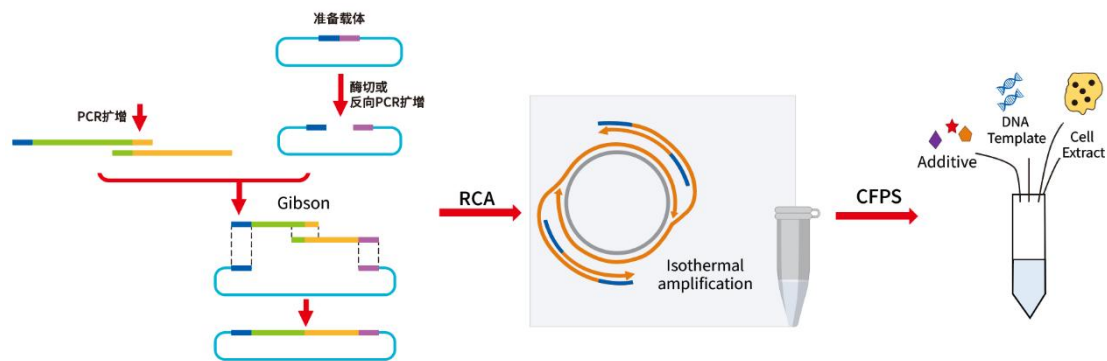


图 3-9 滚环扩增制备模板 DNA 的流程示意图

3.7.2 RCA 制备模板 DNA 的操作示例

3.7.2.1 DNA 片段的准备及 Gibson Assembly

使用相关软件（SnapGene 等）进行含有同源臂引物的设计。然后用引物分别扩增目的基因和 pJL1 质粒骨架。使用本公司的 DNA Assembly Mix Ultra 无缝克隆试剂盒，参照 3.5.3.2 的示例将扩增的多个 PCR 片段连接成环。

3.7.2.2 RCA

推荐使用本公司的 phi29 聚合酶，参照说明书配置如表的反应体系，如表 3-9 所示。在 PCR 小管中加入 phi29 扩增所需各试剂（除 phi29 外），混匀，95°C 孵育 3 min（需设置 105°C 热盖）；样品放低温完全冷却后，加 1 μ l phi29 (10 U/ μ l)，混匀，37°C 孵育 2 h，65°C 孵育 10 min。phi29 产物（即 RCA 产物）放 4°C 待用，长期保存需放 -20°C。

表 3-9 RCA 反应体系

试剂	加入量
10× phi29 buffer	2 μ l
6 随机引物(100 μ M, 3'硫代修饰)	10 μ l
dNTPs (10 mM)	2 μ l
phi29 聚合酶(10 U/ μ l)	1 μ l
模板(无缝克隆产物)	2 μ l
ddH ₂ O	To 20 μ l

3.7.2.3 RCA 产物检测与鉴定

由于 phi29 产物分子量较大，直接电泳难以检测其扩增效果，故需使用一种内切酶(如 BsaI)酶切产物后再进行电泳，更容易检测其扩增情况。按照表 3-10 向 PCR 小管中加入酶切体系所需各试剂，混匀，37°C 孵育 1 h，80°C 孵育 20 min；酶切产物取 10 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳检测，根据 DNA Marker 大致估测 RCA 产物的浓度。

表 3-10 RCA 产物酶切体系

试剂	加入量
10× CutOne [®] Buffer	2 μ l
LightNing [®] BsaI	1 μ l
phi29 产物	1 μ l
ddH ₂ O	16 μ l

如需对 phi29 扩增产物进行测序，请预先咨询测序公司是否可以对 phi29 产物直接进行测序。若可以，对产物适量稀释后再送测序；若不行，则需按表 3-10 先对产物进行酶切，将酶切产物送测序。

4 无细胞反应

4.1 无细胞胞体系配制

将试剂盒中溶液 A、溶液 B 于冰上解冻，解冻后的溶液涡旋混匀，短暂离心使管内液体汇集于管底。下表为 50 μl 无细胞表达反应体系示例，反应体积可根据需求灵活调整，各组分加量等比例缩小或放大，模板的添加量建议进行调整和优化。阴性对照组将模板替换为 ddH₂O。

表 4-1 无细胞反应体系

试剂	加入量
Solution A	15 μl
Solution B	30 μl
模板	200~500 ng
ddH ₂ O	To 50 μl

核糖核酸酶污染会降解转录产物、转运 RNA 及其他 RNA，抑制蛋白质合成，大幅降低产量。实验过程中须使用无核糖核酸酶的离心管和吸头，并佩戴手套操作。首次进行蛋白质体外合成实验时，建议同时使用试剂盒中 pJL1-sfGFP 作为阳性对照。

4.2 DNA 模板的添加量要求

4.2.1 质粒

反应体系中添加的质粒 DNA 终浓度需控制在 2 nM 左右，相当于质量浓度为每 1 kb 1~3 ng/ μl 。例如，对于 3 kb 的质粒 DNA（其中目的基因长度约 1 kb），无细胞体系中模板 DNA 终浓度为 $(1\sim 3)\times 3 = 3\sim 9$ ng/ μl ，计算时考虑全质粒长度，而非单独的目的基因长度。

4.2.2 线性 DNA

反应体系中线性 DNA 模板添加的终浓度需控制在 4 nM 左右，即质量浓度为每 1 kb 2~6 ng/ μl 。未经纯化的 PCR 反应液可直接用于无细胞反应，但效果不如纯化后，且添加体积不得超过反应体系总体积的 10%，原因是 PCR 反应液中的盐会改变反应体系的盐离子浓度，降低转录和翻译效率。建议使用 DNA 纯化试剂盒对 PCR 反应液进行纯化，若 PCR 产物浓度较低，建议使用真空浓缩仪对产物进行浓缩。

4.2.3 RCA 产物

RCA 产物可不经纯化，直接用于无细胞反应。根据酶切检测预估的 RCA 产物浓度，投入到无细胞体系中的终浓度为 6~10 ng/ μl 。

4.3 无细胞反应容器及设备的选择

无细胞体系中存在能量物质的代谢过程，需要氧气的参与，因此需要保证氧气的供给。当反应体积为 50 μl 时，推荐使用圆底 2 ml EP 管；反应体积为 5 ml 时，可使用 50 ml 离心管，并使用透气的盖子；反应体积为 50 ml 时，可使用 500 ml 的三角摇瓶。其他体积的无细胞反应，相应调整反应容器的大小，建议反应体积 \leq 10%容器体积。

为保证氧气的供给，无细胞反应需放置在可控温的摇床或者振荡器中。如使用摇床，转速可以设置为 200~250 rpm。

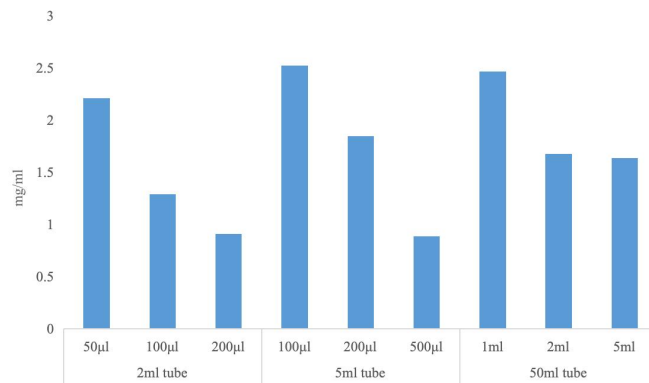


图 4-1 不同反应容器及体积的表达 sfGFP 结果

4.4 无细胞反应温度和时间

除反应体积和溶氧外，温度和时间是影响无细胞表达的其它重要因素。反应温度和时间需根据不同蛋白进行优化。首次蛋白表达实验推荐反应条件为 26 $^{\circ}\text{C}$ 、16 h。如果蛋白表达量较高，溶解性不佳，可调整反应条件至 18 $^{\circ}\text{C}$ 、24 h。降低反应温度，可提高蛋白的溶解度，但会降低蛋白表达量，因此需要延长反应时间。

5 无细胞表达产物检测

5.1 SDS-PAGE

一般情况使用 SDS-PAGE 检测目标蛋白是否成功表达。以无细胞反应后总体系测定蛋白总体表达情况，以离心后的反应液上清测定蛋白的可溶部分。分别约 1 μl 反应液和离心后上清，进行 SDS-PAGE。对比未加模板的反应体系，观察目的蛋白分子量附近是否有特异性条带。可参照下列步骤进行 SDS-PAGE 操作。

- 分别取 1 μl 反应体系、2.5 μl 4 \times 蛋白 loading 和 6.5 μl ddH₂O 于 PCR 小管中，混匀；
- 95 $^{\circ}\text{C}$ 条件下加热变性 10 分钟；

- c. 将蛋白胶放于电泳槽中，加入适量电泳缓冲液，分别将 10 μ l 混合样品全部上样于蛋白胶泳道中，适当电压进行电泳，电泳时长根据蛋白分子量进行调整；
- d. 电泳结束后，使用考马斯亮蓝染色液对凝胶进行染色，检测目标蛋白条带。（阳性对照 sfGFP 蛋白的条带分子量约为 33 kDa）

如图 5-1 所示展示了 3 种目标蛋白进行 SDS-PAGE 后的胶图结果，框所示为目标蛋白条带位置。其中“全”表示无细胞反应后总体系，“上清”表示无细胞反应后总体系离心后上清。

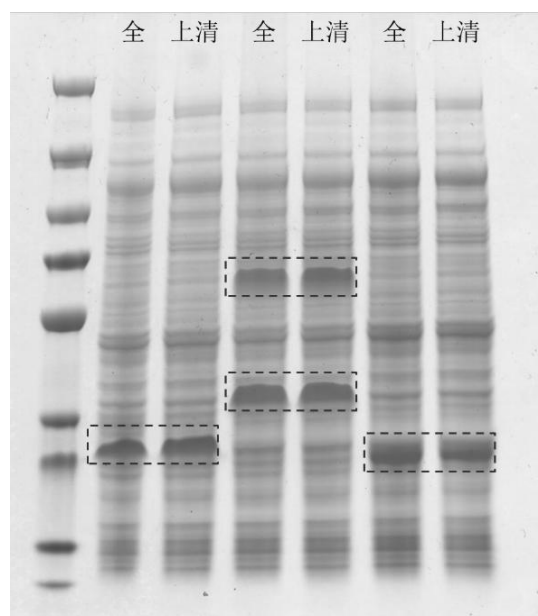


图 5-1 SDS-PAGE 示例

5.2 其他检测方法

无细胞表达阳性质粒表达的 sfGFP 蛋白产量可达到 2~3 mg/ml，SDS-PAGE 可清晰观察到目的蛋白条带。但不同蛋白的表达情况差异非常大，当蛋白表达量低于 0.1 mg/ml 时，SDS-PAGE 将很难分辨目的蛋白条带。因此除 SDS-PAGE 外，需要根据目的蛋白的特性建立合适的蛋白检测方法，如荧光蛋白及其融合蛋白可检测其荧光强度判断目的蛋白的表达情况，此外还有 Western blot、活性测定、Elisa 等方法。

6 无细胞表达产物纯化

由于无细胞体系中含有大量与转录翻译相关的蛋白质,如若后续需要对表达的目的蛋白进行功能检测等分析,建议先对无细胞反应后产物进行粗略纯化。针对目的蛋白的性质与标签等,可选择不同的纯化策略。例如:含多聚组氨酸标签的蛋白可使用 Ni 亲和层析,含 strepII 标签的可使用链霉亲和素亲和层析,抗体可用 protein A 纯化。

少量体积 (≤ 1 ml) 表达产物推荐使用对应的磁珠纯化,此纯化过程简便快捷,纯化效果较好。反应体积较大 (≥ 5 ml) 可使用对应的基质进行柱纯化。

以 Ni 磁珠为例:

- a. 离心: 无细胞反应产物离心, 参数: 15000 g、4°C、10~20 min, 离心后留上清待用;
- b. 磁珠准备: 取适量体积 Ni 磁珠, 加入 5 倍体积 ddH₂O 冲洗, 放磁力架上, 弃上清, 此操作重复 3 次;
- c. 平衡: 磁珠中加入含约 200 mM 盐的缓冲液, 移液器反复吹打混匀, 放磁力架上, 弃上清;
- d. 结合: 取无细胞产物离心后上清与磁珠, 充分混合。样品体积较大可放旋转混合仪上, 4°C 孵育约 1 h; 样品体积较小则直接放于冰上静置孵育约 1 h, 期间每隔 5~10 min 轻弹管壁或吹打混匀;
- e. 孵育后样品放磁力架上, 吸出上清(Flow), 上清注意留样;
- f. 洗杂: 向磁珠加入适量体积的低浓度咪唑缓冲液(约 20 mM), 移液器吹打混匀, 放磁力架上, 吸出上清(Wash), 上清留样;
- g. 洗脱: 向磁珠加入适量体积的高浓度咪唑缓冲液(100~400 mM), 移液器吹打混匀, 放磁力架上, 吸出上清(Elution), 上清留样;
- h. SDS-PAGE: 离心后上清、结合后上清(Flow)、洗杂后上清(Wash)与洗脱后上清(Elution) 进行 SDS-PAGE 检测;
- i. 洗脱后上清中若目的蛋白纯度较高, 透析至相应的储存缓冲液中以去除其中的咪唑。

7 无细胞表达实例

7.1 常规蛋白

7.1.1 绿色荧光蛋白 sfGFP 和红色荧光蛋白 mCherry

使用无细胞试剂盒 Cell-free Protein Synthesis Kit 表达绿色荧光蛋白 sfGFP 和红色荧光蛋白 mCherry。反应容器为 2 ml EP 管，反应体积 50 μ l，反应条件 26 $^{\circ}$ C、16 h，反应结束外观如图 7-1 所示，从左至右分别为阴性对照、sfGFP、mCherry。



图 7-1 无细胞表达绿色荧光蛋白 sfGFP 和红色荧光蛋白 mCherry 的结果

7.1.2 其他常规蛋白

使用无细胞试剂盒 Cell-free Protein Synthesis Kit 表达五种不同分子量的蛋白。反应体积为 50 μ l，反应条件 26 $^{\circ}$ C、16 h。取 1 μ l 进行 SDS-PAGE，结果如图 7-2 所示，红色箭头所指为目的蛋白相应的条带。

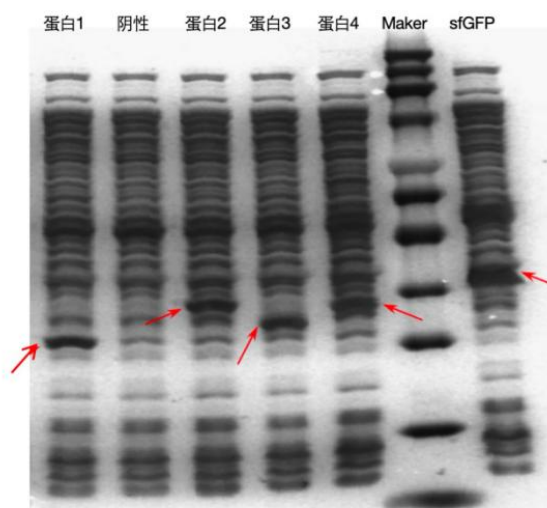


图 7-2 无细胞表达多种蛋白的结果

7.2 含二硫键蛋白

7.2.1 高斯荧光素酶

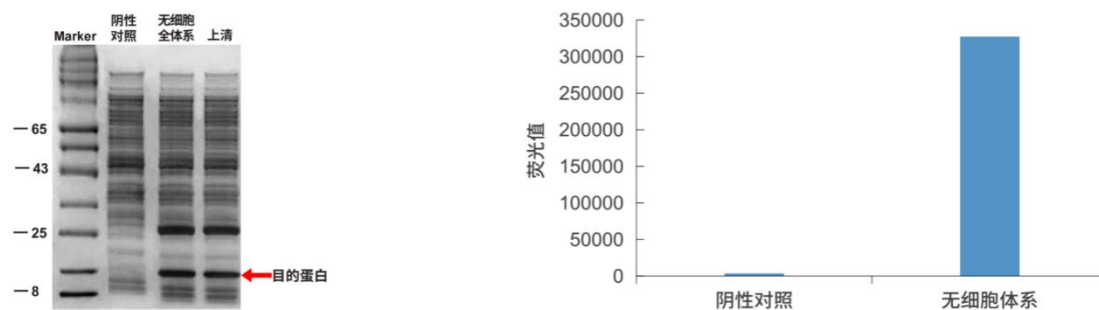


图 7-3 无细胞表达高斯荧光素酶及活性检测结果

使用无细胞试剂盒 Cell-free Protein Synthesis Kit Max 表达含有多对二硫键的高斯荧光素酶。反应体积为 50 μl ，反应条件 26 $^{\circ}\text{C}$ 、16 h。分别对其进行 SDS-PAGE 与活性检测，结果如图 7-3 所示。

7.2.2 纳米抗体

使用无细胞试剂盒 Cell-free Protein Synthesis Kit Max 表达两个纳米抗体。反应体积为 50 μl ，反应条件 26 $^{\circ}\text{C}$ 、16 h。取 1 μl 进行 SDS-PAGE，结果如图 7-4 所示。使用磁珠纯化后，估算其产率约为 0.2 mg/ml。对这两个 GFP 的纳米抗体进行功能测试，验证了此纳米抗体的功能良好。（参考文献 Kirchhofer A, Helma J, Schmidthals K, et al. Modulation of protein properties in living cells using nanobodies. *Nat Struct Mol Biol.* 2010;17(1):133-138.）

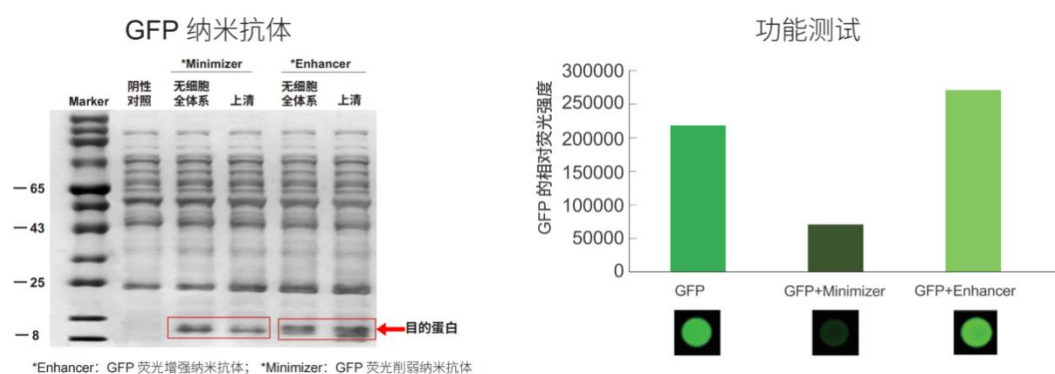


图 7-4 无细胞表达纳米抗体及活性检测的结果

7.2.3 vtPA

使用无细胞试剂盒 Cell-free Protein Synthesis Kit Max 表达 vtPA，其含有 9 对二硫键。反应体积为 50 μl ，反应条件 26 $^{\circ}\text{C}$ 、16 h。反应结束测定 vtPA 酶活，酶活测定体系：10 μl 反应物上清、70 μl 缓冲液、20 μl 5 mM 的 S-2288 底物，37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h，测定 405 nm 处的吸光度。图 7-5 的活性检测结果显示 Cell-free Protein Synthesis Kit Max 能够表达出正确折叠且具备功能的 vtPA。

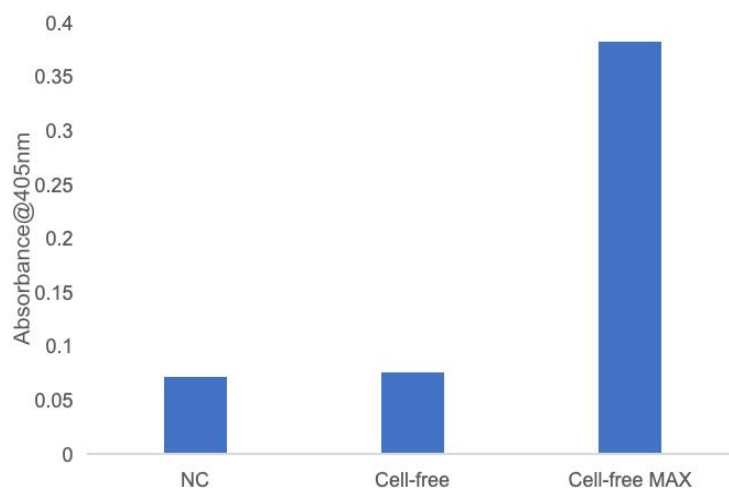


图 7-5 无细胞表达 vtPA 活性检测的结果

7.2.4 Fab

使用无细胞试剂盒 Cell-free Protein Synthesis Kit Max 表达 Anti-CD28 Fab。反应体积为 50 μl ，反应条件 26 $^{\circ}\text{C}$ 、16 h，重链、轻链 DNA 投入量分别为 8 ng/ μl 、8 ng/ μl 。

反应物上清经 Ni-IDA 磁珠进行一步纯化。Elisa 测试无细胞表达 Anti-CD28 Fab 的亲和力，并与真核表达的 Fab 进行对比，如图 7-6 所示。结果现实无细胞表达 Anti-CD28 Fab 与真核表达的 Fab 具有可比的活性。

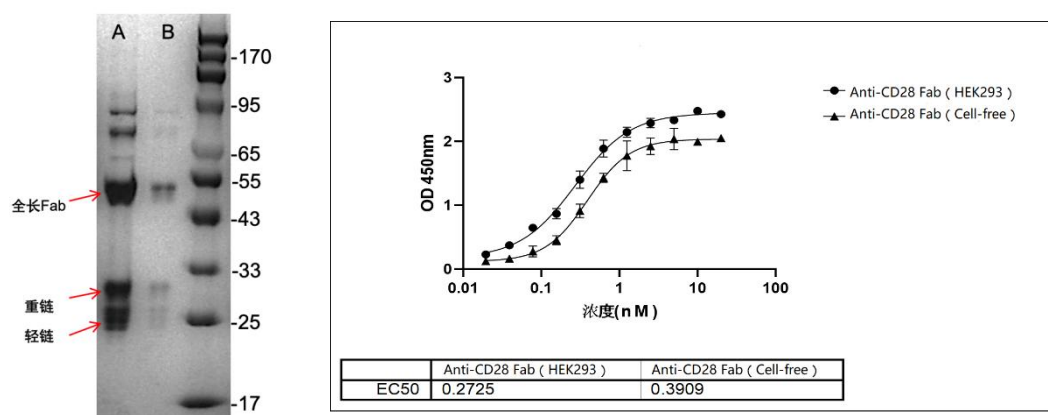


图 7-6 无细胞表达 Fab 及活性测定结果

7.3 非天然氨基酸

7.3.1 非天然氨基酸概述

非天然氨基酸（ncAA）作为人工合成的氨基酸衍生物，其独特的化学性质和生物活性为蛋白质工程提供了无限可能。利用终止密码子在蛋白质中插入 ncAA（图 7-7），可以广泛拓展蛋白质的结构和功能，增加蛋白质的新兴应用。

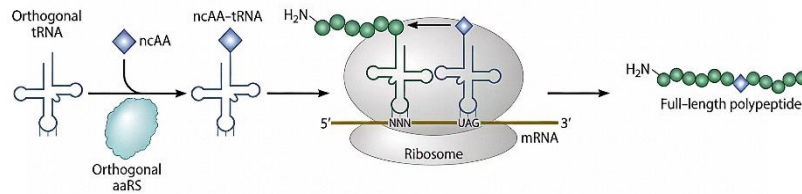


图 7-7 终止密码子在蛋白质中插入 ncAA

在蛋白质工程中引入 ncAA 需要解决一系列技术挑战，如遗传密码扩展、tRNA/氨酰-tRNA 合成酶对的优化等。传统的细胞内表达存在很多问题，比如细胞毒性、跨膜运输等都会造成 ncAA 的低效表达。无细胞表达系统具有更高的灵活性和可定制性，可以根据需要调整反应体系中的成分和条件，来适应不同 ncAA 和蛋白质的需求，实现对 ncAA 插入的精确控制和高效插入。此外，使用无细胞表达体系插入 ncAA，将大幅降低成本。

愚公生物开发出独家的非天然氨基酸无细胞试剂盒，优势在于：试剂盒自带独立的 aaRS、tRNA、ncAA 组分，可针对不同蛋白进行添加量的优化；操作简便，客户只需准备含 TAG 密码子的 DNA；插入效率较高，pAcF 和 pAzF 单点插入效率达到 60% 以上。愚公已开发三种非天然氨基酸的无细胞试剂盒，可利用琥珀密码子 TAG 在目的蛋白中定点插入 4-乙酰基-L-苯丙氨酸（pAcF）、4-叠氮基-L-苯丙氨酸（pAzF）或 N ϵ -巴豆酰基-L-赖氨酸（Kcr）。

7.3.2 示例：在 sfGFP 中插入 pAzF 和 pAcF

选择 sfGFP 的 Y74、Y106、Y143、Y182 位点，分别将其密码子突变为 TAG，制备相应的 DNA 模板。投入无细胞试剂盒（pAzF 或 pAcF）进行表达，含非天然氨基酸的全长 sfGFP 表达结果如图 7-8 所示。

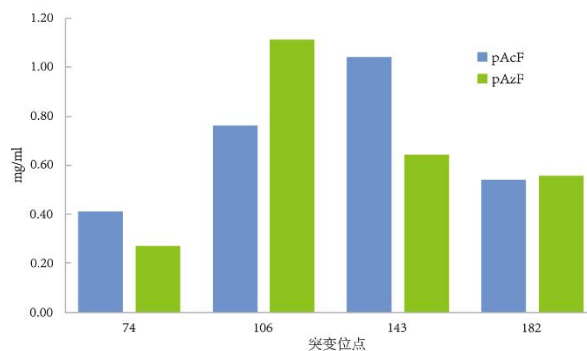


图 7-8 在 sfGFP 的不同位点插入非天然氨基酸 pAzF 或 pAcF 的结果

8 常见问题与解决方法

问题	原因	解决方法
阳性质粒 无表达	试剂盒失活	试剂盒储存于-80°C（冻干产品储存于-20°C）； 尽量减少冻融循环次数；
	核酸酶污染	戴上手套，使用不含核酸酶的水、枪头和离心管；
目的蛋白 产量低或 无表达	基因结构	确保目的基因上下游序列按照要求设计；
	DNA 序列	按照大肠杆菌密码子使用偏好进行密码子优化； 在目的蛋白 N 端添加融合标签，或更换融合标签 与位置；
	DNA 模板 制备	DNA 模板制备，注意去除乙醇、RNase； 质粒抽提与 PCR 产物纯化最后洗脱步骤须使用 RNase-free 的 ddH ₂ O； PCR 制备的模板注意是否有非特异性扩增，影响 生产效率；
	DNA 模板 添加量	DNA 模板需精确定量，并考虑对添加量进行优化；
目的蛋白 不可溶	二硫键	含有二硫键的蛋白使用基础款试剂盒表达会生成 包涵体，需选择 Max 版本；
	表达过快	使用较低的温度（例如 16°C）和更长的反应时间 （例如 24 h）； 选择添加折叠伴侣的 Pro 版本；

9 无细胞试剂盒相关产品信息

产品名称	货号	功能
<u>2× S705 HiFi Master Mix</u> (<u>2× S705 高保真预混液</u>)	EG24110S	PCR
	EG24110M	
	EG24110L	
<u>LightNing® DpnI</u>	EG15585S	酶切 PCR 的模板质粒
<u>DNA Assembly Mix Ultra</u> (<u>快速多片段 DNA 无缝克隆预混</u>)	EG24204S	Gibson assembly
<u>Golden Gate Assembly Kit (BpiI)</u> (<u>Golden Gate 组装试剂盒 (BpiI)</u>)	EG25209V	Golden gate
	EG25206S	
<u>phi29 II DNA Polymerase</u> (<u>phi29 II DNA 聚合酶</u>)	EG25102S	RCA
	RG25102M	
<u>LightNing® BsaI</u>	EG15518S	RCA 产物酶切
<u>LightNing® NcoI</u>	EG15550S	质粒酶切
<u>LightNing® BsrGI</u>	EG23505S	质粒酶切
<u>T4 DNA Ligase (Fast)</u> (<u>T4 DNA 连接酶</u>)	EG15205S	DNA 片段连接
<u>1kb DNA Ladder</u> (<u>1kb 分子量标准</u>)	EG21909M	DNA marker
<u>Color Prestained Protein Marker (8~250 kDa)</u> (<u>彩色预染蛋白 Marker (8~250 kDa)</u>)	EG23302S	蛋白 marker
	EG23302M	
<u>Cell-Free Protein Synthesis Kit (Lyophilized)</u> (<u>无细胞蛋白合成试剂盒 (冻干粉)</u>)	EG24302S	无细胞常规试剂盒 冻干粉版
	EG24302M	
<u>Cell-Free Protein Synthesis Kit Pro (Lyophilized)</u> (<u>无细胞蛋白合成试剂盒 (促溶加强版冻干粉)</u>)	EG25303S	无细胞试剂盒 Pro 冻干粉版
	EG25303M	
<u>Cell-Free Protein Synthesis Kit Max (Lyophilized)</u> (<u>无细胞蛋白合成试剂盒 (二硫键增强版冻干粉)</u>)	EG25304S	无细胞试剂盒 Max 冻干粉版
	EG25304M	
<u>Cell-Free Protein Synthesis Kit (pAcF)</u> (<u>无细胞蛋白合成试剂盒 (非天然氨基酸 pAcF 版)</u>)	EG25330S	支持插入 非天然氨基酸 pAcF
<u>Cell-Free Protein Synthesis Kit (pAzF)</u> (<u>无细胞蛋白合成试剂盒 (非天然氨基酸 pAzF 版)</u>)	EG25331S	支持插入 非天然氨基酸 pAzF
<u>Cell-Free Protein Synthesis Kit (Kcr)</u> (<u>无细胞蛋白合成试剂盒 (非天然氨基酸 Kcr 版)</u>)	EG25332S	支持插入 非天然氨基酸 Kcr

注：点击对应产品名称可以直接跳转到产品详情页。