

Cell-Free Protein Synthesis Kit Max (Lyophilized)

REF: EG25304-S/M

储存条件

4°C运输。

-20°C保存，有效期 12 个月。

冻干粉复溶后，-20°C保存不超过 1 个月，-80°C保存不超过 12 个月。

产品组成

组分	规格 S	规格 M
Cell-free system solution A Max (Lyophilized)	1 瓶 (复溶后 300 µl)	1 瓶 (复溶后 1.5 ml)
Cell-free system solution B (Lyophilized)	1 瓶 (复溶后 600 µl)	1 瓶 (复溶后 3 ml)
CFPS-Control Plasmid	2 µg	2 µg

产品简介

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，表达出蛋白质。无细胞蛋白表达是一种不依赖于活菌，能够快速、灵活地大量表达蛋白质，和传统的重组表达体系相比有众多的优势：

1. 蛋白表达快，1~2 h 即可表达出目的蛋白，8~24 h 即可达到最大量。
2. 蛋白表达量高，最高可达到 3 mg/ml 以上的蛋白。
3. 反应简单灵活，仅需向反应体系中加入 DNA 或 RNA 模板，可使用 96 孔板或离心管进行反应。

注：本货号产品可表达常规蛋白，更适用于表达含二硫键的蛋白。

适用范围

产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。

操作说明

1. 基因构建

目的基因的构建对于蛋白表达至关重要，推荐使用下图的构建方式。可以将目的基因构建到本试剂盒附带的阳性质粒上（质粒图谱详见外包装标签扫描二维码内文件），即如下的构建方式；也兼容 pET-9a、pET-23a 等含有 T7 启动子，但不含乳糖操纵子 (lac) 的 PET 系列质粒。

```

TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAAACGGTTTCCCCTCTAG
AAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAGGAGAATATACCATG.....
.....TAAAGTCGACCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAA
GGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGC
ATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTG
    
```

说明：

- T7 启动子
- g10 stem-loop
- ribosome binding site RBS
- 目的基因
- T7 terminator

图 1 目的基因构建示例

注：含有 lac 乳糖操纵子的质粒（如 pET28a 等）会对产量有较大影响，不建议直接使用。

阳性质粒的 DNA 序列示意图如下所示：

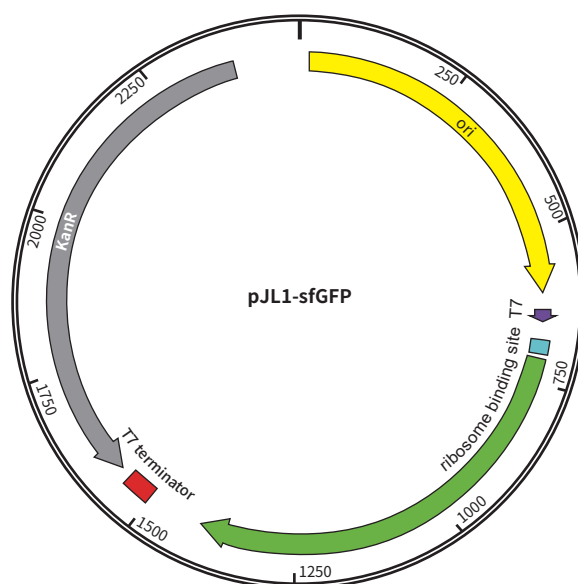


图 2 阳性质粒 DNA 序列示意图

2. 模板制备

无细胞蛋白合成试剂盒可以使用 DNA 或 mRNA 作为模板表达重组蛋白。采用的 DNA 模板可以是质粒，可以是 PCR 产物，也可以是使用 phi29 进行 RCA 滚环扩增的产物。

- (1) 质粒：通过基因公司合成，或亚克隆获得适用于无细胞反应的质粒，并采用柱纯化方式提取质粒；
- (2) PCR 产物：设计引物，正向引物在 T7 启动子上游至少 200 bp 左右，反向引物在终止密码子下游至少 200 bp 左右（包含 T7 terminator），对模板进行扩增，可以使用 2× S705 HiFi Master Mix（货号：EG24110），获得的 DNA 线性片段可以不经纯化直接投入到无细胞反应体系中。上下游 200 bp 以上碱基的作用是保护 DNA 线性片段不被内源性外切酶降解，扩增引物可使用 F：CAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTAT，R：GCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAG。
- (3) RCA 产物：使用 phi29 聚合酶、随机六引物进行滚环扩增 RCA，获得的 DNA 产物可直接用于无细胞反应体系中。
- (4) PCR 和 RCA 可以和 Golden Gate 以及 Gibson Assembly 联用，将极大提高 DNA 模板制备的速度和通量。

注：DNA 模板使用前需要准确定量；使用含有单独去蛋白 Wash Buffer 的高纯度质粒提取试剂盒进行质粒提取，避免引入 RNase A；公司返回的质粒需强调使用柱纯化方式，否则不能直接用于无细胞反应；柱法纯化 DNA 模板推荐用无核酸酶水洗脱。

3. 无细胞蛋白表达

- (1) 分别用 300 μl 和 500 μl 的 RNase Free Water 将冻干粉 Cell-free system solution A Max 和冻干粉 Cell-free system solution B 复溶（或分别用 1.5 ml 和 2.5 ml 的 RNase Free Water 将冻干粉 Cell-free system solution A Max 和冻干粉 Cell-free system solution B 复溶），可使用混悬仪或移液器吹打使其完全混合均匀。
- (2) 根据反应体系总量计算所需的 A 液和 B 液（体积比 1:2），将所用的试剂于冰上添加到反应容器中（例如 2 ml 圆底离心管），并混匀。操作过程需全程佩戴手套、口罩，并采用无酶源的移液器吸头和反应容器，避免引入核酸酶。无细胞反应体系可参照下表进行混合配制：

表 2 反应体系的配制

组分	终浓度	50 μl 体系	100 μl 体系
Cell-free system solution A Max	30%	15 μl	30 μl
Cell-free system solution B	60%	30 μl	60 μl
模板	5~10 μg/ml	5~10 μg/ml	5~10 μg/ml
无核酸酶水	\	补足至 50 μl	补足至 100 μl

- (3) 向反应体系中加入模板 DNA，推荐 DNA 模板的添加终浓度为 5~10 μg/ml，可对 DNA 模板添加量进行优化。
- (4) 将反应容器放置到普通摇床或恒温混匀仪中，进行无细胞蛋白表达，推荐反应温度为 25~30℃。降低温度会降低蛋白的合成速率，但会增加蛋白的可溶性。一般反应 8 h 左右即可达到最大的蛋白产量，也可以过夜反应 16 h。当反应温度降低时，应适当增加反应时间。
- (5) 无细胞蛋白表达需要充足氧气，当使用 2 ml 圆底离心管作为反应容器时，反应体系不超过 100 μl。无细胞蛋白反应可以等比例放大，放大的反应体系需要使用更大的反应容器，例如摇瓶等，同时保证摇床的转速（200 rpm）。

4. 检测

反应结束，取反应液（检测全部蛋白）或反应上清（检测可溶蛋白）1 μl 左右，进行 SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳检测目的蛋白的表达。

5. 阳性对照

本试剂盒中有绿色荧光蛋白 sf-GFP 质粒作为阳性对照，可通过肉眼直接观测反应结果。sf-GFP 成功表达后，无细胞反应体系将呈现明显的绿色。如需对 sf-GFP 进行精确定量，可使用酶标仪进行检测（Ex/Em=485/528 nm）。

特殊提示 - 膜蛋白表达

本试剂盒支持膜蛋白的体外合成。若要获得可溶的膜蛋白产物，需要在反应体系中额外添加外源添加剂；仅使用试剂盒自带组分，膜蛋白产物大多会以沉淀形式存在。可尝试选用非离子型去垢剂（如 DDM、Brij 系列、Triton X-100 等）或纳米盘体系，以改善膜蛋白的可溶性与稳定性。去垢剂种类、添加条件需要针对不同靶标膜蛋白自行筛选优化。