

Cell-Free Protein Synthesis Kit (Kcr)

REF: EG25332S

储存条件

-80℃保存，有效期 12 个月。

干冰运输。用户开封后，将无细胞蛋白表达反应组置于 -80℃储存。
为避免反复冻融，可根据反应用量，将 A 液和 B 液分别分装后用液氮速冻后再置于 -80℃储存。

产品组成

组分	规格
Cell-free system solution A	300 μl
Cell-free system solution B	400 μl
CFPS-Control Plasmid	2 μg
非天然氨基酸 Kcr (50×)	50 μl
tRNA (25×)	60 μl
氨酰 tRNA 合成酶 (10×)	120 μl

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。该产品为非天然氨基酸——Nε-crotonyl-L-lysine (Kcr)，能够利用 DNA 序列中的琥珀终止密码子 TAG 向目的序列中定向插入 Kcr。试剂盒中包含非天然氨基酸 Kcr、tRNA、氨酰 tRNA 合成酶三种额外成分，可根据客户具体实验进行添加量的优化。

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。

```

TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCCTCTAG
AAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGAATATACCATG.....
.....TAAAGTCGACCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAA
GGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGC
ATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTTG
    
```

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：

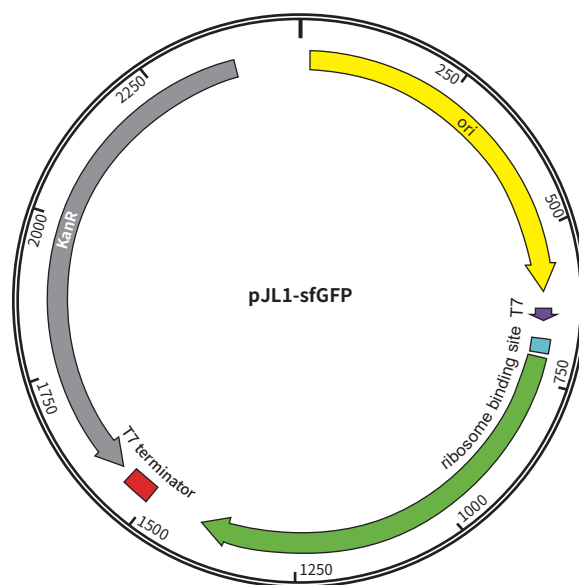


图 2 阳性质粒 DNA 序列示意图

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：CAGGGGGAACGCCTGGTATCTTTAT，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) 根据反应体系总量计算所需的 A 液和 B 液，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 μ l 体系	100 μ l 体系
Cell-free system solution A	30%	15 μ l	30 μ l
Cell-free system solution B	40%	20 μ l	40 μ l
模板	5~10 μ g/ml	5~10 μ g/ml	5~10 μ g/ml
非天然氨基酸 Kcr (50×)	1×	1 μ l	2 μ l
tRNA (25×)	1×	2 μ l	4 μ l
氨酰 tRNA 合成酶 (10×)	1×	5 μ l	10 μ l
无核酸酶水	\	补足至 50 μ l	补足至 100 μ l

- (2) 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 μ g/ml，可对 DNA 模板添加量进行优化。
- (3) 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。
- (4) 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 μ l。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 μ l 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）。