



Cell Free Protein Expression Kit (ECL)

体外蛋白表达试剂盒（线性模板）

版本号: V250301

货号: R202

保存: -80°C

运输: 干冰

货号	规格
R202-08	8 rxn

【产品概述】

体外蛋白表达试剂盒是一款简单快速的蛋白质体外表达系统。其基于大肠杆菌内源的转录和翻译机制，在体外建立高效的无细胞蛋白表达反应体系，使转录与翻译同时进行，节省了细胞内表达的耗时过程，比如质粒转化感受态细胞、阳性克隆鉴定、少量诱导、大量诱导、细胞裂解等。本试剂盒兼容 Tac 和 T7 表达系统，适用于线性模板。

试剂盒中包括即用型预混液和阳性对照模板。在一个反应体系中，仅需要将蛋白表达模板和 CFPE Master Mix 混合，即可进行蛋白表达。

【产品特点】

1. 操作简单：只需将蛋白表达模板和 CFPE Master Mix 混合。
2. 兼容性强：兼容 Tac 和 T7 表达系统。
3. 适用性广：可表达多种类型蛋白质，包括具有细胞毒性的蛋白。

【产品组分】

组分货号	组分名称	R202-08
ZR202-08-101	CFPE Master Mix (ECL)	80 µl
ZR202-08-102	LET Positive Control	10 µl

【保存条件】

CFPE Master Mix 于-80°C保存，避免反复冻融。LET Positive Control 于-80°C或-20°C保存。保质期 12 个月。

【注意事项】

1. 自备材料：水浴锅或培养箱、移液器、离心机、1.5 ml 离心管、实验操作台、吸头。建议选择无酶实验耗材，并保证实验操作台的整洁干净。
2. 利用体外蛋白表达系统进行蛋白表达的前提是表达载体或模板的质量及纯度。模板不能含有核酸酶（包括 DNase 和 RNase），不能含有转录翻译的抑制剂（比如 Cl⁻、SDS、EDTA，溴化乙锭）。

【实验步骤】

可以通过无缝克隆技术制备线性 DNA 模板，建议制备线性模板后，再进行一次纯化（可以使用 PCR 纯化试剂盒）。

注：最后洗脱应使用无核酸酶的水。可适当调整模板的最终浓度，保证蛋白质产量。本试剂盒中提供了阳性对照线性模板 LET Positive Control，用于验证反应预混液的性能和实验操作过程。

1. 将培养箱或水浴锅预热到 29°C。
2. 将 CFPE Master Mix (ECL) 和 LET Positive Control 从-80°C中取出，置于冰上直至完全解冻。
注：使用前组分需一直放在冰上。为减少冻融次数，请按您需要的反应数量进行解冻。
3. 请在冰上操作，准备 1.5 ml 的离心管用于反应。
4. 将 9 µl CFPE Master Mix (ECL) 加入到离心管。
5. 将 1 µl 的 LET Positive Control 加入到阳性对照管中。阳性对照线性模板的最终浓度为 10 ng/µl。或将 1 µl 的线性模板加入到离心管中，线性模板的最终浓度为 10 ng/µl。

注：操作时避免产生气泡。体外蛋白表达系统对 DNA 浓度高度敏感。请将 DNA 模板与 CFPE Master Mix (ECL) 充分混匀。

6. 阴性对照：将 9 µl CFPE Master Mix (ECL) 加入到离心管，加入 1 µl 的 Nuclease-free water。



- 每个离心管的终体积为 10 μl 。
- 为避免移液误差,对于多个反应,总体积需高于单个反应所需体系等比放大后的 5% 以上。如: 6 次反应 ($6 \times 10 = 60 \mu\text{l}$), 制备 63 μl 的总体积。
- 将反应体系轻柔混匀,用离心机低速瞬时离心,避免产生气泡。
- 将反应体系置于培养箱、恒温金属浴或者水浴锅,在 29°C 下孵育 16 h。
- 孵育完成后,可进行后续实验,或者将反应液用液氮速冻,置于 -80°C 冰箱备用。

体外蛋白表达反应各组分添加体积(请按顺序添加各组分),以阳性对照举例:

组分	阳性对照/模板	多个反应(如: 6 个)	阴性对照
CFPE Master Mix (ECL)	9 μl	56.7 μl	9 μl
LET Positive Control	1 μl	6.3 μl	-
Nuclease-free water	-	-	1 μl
总体积	10 μl	63 μl	10 μl

【补充说明】

1. 实验流程中可优化的参数

参数	优化方案
反应温度	25-30°C (较低的温度有利于蛋白产出)。
反应时间	30 min-16 h 以上。反应通常在 5-10 min 内开始。
反应所需的空间	为获得更高产量的蛋白,反应体系应建立在充足的空间中。如在 1.5 ml 离心管中建立 10 μl 的反应。对于高通量应用,可选择多孔板并控制反应过程中的挥发和氧气供给。如使用一个多孔板盖玻片。
模板浓度	反应体系中,我们建议模板的最终浓度不低于 10 ng/ μl 。
模板设计	对于线性 DNA 模板,建议在启动子上游添加一个 250 bp 的非编码侧翼区,在终止子下游添加一个 100 bp 的非编码侧翼区。
启动子的强度	测试显示: 含有 T7、Tac 以及大肠杆菌内源的启动子载体,在 CFPE Master Mix 中,均能使目的蛋白表达。

2. 常见问题与解决方案

问题	可能原因	解决方法
蛋白产量低	DNA 模板质量不高	按照提供的模板制备程序进行制备; 使用无核酸酶的水进行洗脱。
	模板浓度低	模板终浓度不低于 10 ng/ μl 。
	使用了弱启动子	尝试不同强度的启动子。通常情况下,强启动子会得到高产量蛋白。
	反应空间太小	为了达到最高产量,需使用大于反应体积的容器。例如,在 1.5 ml 或 2 ml 的离心管中进行 10 μl 的反应。
	模板设计不当	如 N 或 C 端使用了多肽标签,可能会影响 RNA 结构和降低翻译水平。尝试将融合标签转移到另一端。如没有使用标签,可以尝试添加促溶标签,会增加蛋白质的溶解度。
蛋白质产量与预期结果不一致	DNA 模板质量不高	按照提供的模板制备程序进行制备; 使用无核酸酶的水进行洗脱。
	产品储存不当	CFPE Master Mix 对储存温度高度敏感。储存温度为 -80°C。
没有观察到蛋白质的产生	模板设计不当	检查模板序列(启动子序列、载体构建是否正确,是否发生移码)。
	CFPE Master Mix 已失活	如果试剂盒中提供的阳性对照模板没有产生明亮的绿色荧光蛋白,可能 CFPE Master Mix 已经失活,请检查一下存储条件和有效期。反复冻融次数不能超过 6 次。
	蛋白质不能正常折叠/无生物学活性	目的蛋白是否需要形成二硫键,辅助因子或其他添加剂。除了 DNA 模板之外,可能还需要添加助折叠蛋白或其他试剂。为提高正确折叠的概率,孵育温度需低于 30°C。对于膜蛋白,需要将洗涤剂或其他膜形成添加剂(如纳米磷脂盘),添加到 CFPE Master Mix 中。
	产品储存不当	CFPE Master Mix 对储存温度高度敏感。储存温度为 -80°C。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时,本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。在所有情况下,本公司对此产品所承担的责任,仅限于此产品的价值本身。