

体外蛋白表达试剂盒使用说明书

Cell Free Protein Expression Kit

本试剂盒适用于蛋白质的体外表达。

使用前请仔细阅读说明书，并检查试剂组分。

如有任何疑问请与[保定米奇生物科技有限公司](#)联系，我们将为您提供技术支持。

本产品仅用于研究，不可用于临床诊断或治疗。

表 1: Cell Free Protein Expression Kit

货号	名称	规格
MCF-ECP-220008	体外蛋白表达试剂盒（质粒模板） Cell Free Protein Expression Kit (EC)	8 Rxn
MCF-ECP-220024	体外蛋白表达试剂盒（质粒模板） Cell Free Protein Expression Kit (EC)	24 Rxn
MCF-ECP-220048	体外蛋白表达试剂盒（质粒模板） Cell Free Protein Expression Kit (EC)	48 Rxn
MCF-ECP-220096	体外蛋白表达试剂盒（质粒模板） Cell Free Protein Expression Kit (EC)	96 Rxn
MCF-ECL-221008	体外蛋白表达试剂盒（线性模板） Cell Free Protein Expression Kit (ECL)	8 Rxn
MCF-ECL-221024	体外蛋白表达试剂盒（线性模板） Cell Free Protein Expression Kit (ECL)	24 Rxn
MCF-ECL-221048	体外蛋白表达试剂盒（线性模板） Cell Free Protein Expression Kit (ECL)	48 Rxn
MCF-ECL-221096	体外蛋白表达试剂盒（线性模板） Cell Free Protein Expression Kit (ECL)	96 Rxn

目 录

一、产品简介	1
二、技术概述	1
三、试剂盒组分	1
四、储存条件及保质期	2
五、注意事项	2
六、质量控制	2
七、其他实验材料	2
八、模板材料的准备	2
九、使用说明	3
十、可优化的反应参数	4
十一、常见问题分析及解决	5

一、产品简介

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。试剂盒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。本试剂盒兼容 Tac 和 T7 表达系统，有质粒和线性两种不同类型模板的预混液供您选择，为您的研究提供更高的灵活性。体外蛋白表达试剂盒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、小量诱导、大量诱导、细胞裂解等。本产品操作简洁，适用于蛋白表达与功能验证。

二、技术概述

将质粒 DNA 或线性模板加入到体外蛋白表达体系中，用于可溶性蛋白和膜蛋白的表达。因其开放的反应环境更易于操作和处理重组目的蛋白，可以直接用于活性分析或蛋白纯化（通过亲和纯化或磁珠纯化），使体外蛋白表达试剂盒适用于高通量筛选。

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。

三、试剂盒组分

表 2：试剂盒信息

试剂盒货号	组分货号	组分名称	浓度	规格
MCF-ECP-220008	22008	CFPE Master Mix (EC)	1×	80 μL
	2101008	T7P-GFP Positive Control	100 ng/μL	10 μL
MCF-ECP-220024	22008	CFPE Master Mix (EC)	1×	3×80 μL
	2101024	T7P-GFP Positive Control	100 ng/μL	20 μL
MCF-ECP-220048	22008	CFPE Master Mix (EC)	1×	6×80 μL
	2101048	T7P-GFP Positive Control	100 ng/μL	30 μL
MCF-ECP-220096	22008	CFPE Master Mix (EC)	1×	12×80 μL
	2101096	T7P-GFP Positive Control	100 ng/μL	40 μL
MCF-ECL-221008	22108	CFPE Master Mix (ECL)	1×	80 μL
	2103008	LET Positive Control	100 ng/μL	10 μL
MCF-ECL-221024	22108	CFPE Master Mix (ECL)	1×	3×80 μL
	2103024	LET Positive Control	100 ng/μL	20 μL
MCF-ECL-221048	22108	CFPE Master Mix (ECL)	1×	6×80 μL
	2103048	LET Positive Control	100 ng/μL	30 μL
MCF-ECL-221096	22108	CFPE Master Mix (ECL)	1×	12×80 μL
	2103096	LET Positive Control	100 ng/μL	40 μL

四、储存条件及保质期

CFPE Master Mix 请严格储存于- 80 °C条件，且避免反复冻融。

T7P-GFP Positive Control 和 LET Positive Control 低于- 20 °C储存。

有效期 12 个月。

五、注意事项

1. 产品为干冰运输，请您收到后立即置于- 80 °C冰箱进行保存。
2. 请务必在产品解冻后 3 h 之内完成实验操作。
3. 为避免影响试剂盒的活性，尽量避免反复冻融。
4. 为了保证产品质量，请使用 Nuclease-Free 的耗材进行实验。
5. 孵育过程中，任何体积变化都可能会影响试剂盒的性能。尽量避免管盖产生冷凝水。

六、质量控制

为确保产品质量的均一性，每批试剂盒均按照说明书中的反应体系进行过测试。

七、其他实验材料

- | | |
|------------|---------------|
| 1. 水浴锅或培养箱 | 4. 移液器 |
| 2. 离心机 | 5. 1.5 mL 离心管 |
| 3. 实验操作台 | 6. 吸头 |

八、模板材料的准备

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）。

环状 / 质粒 DNA 模板

对于质粒 DNA 模板的制备，建议提取质粒后，再进行一次质粒的纯化（可以使用 PCR 纯化试剂盒）。请注意：最后的洗脱应使用无核酸酶的水，以避免洗脱液中盐和离子干扰预混液的性能。本试剂盒中提供了阳性对照质粒模板 T7P-GFP Positive Control，用于验证反应预混液的性能和实验操作过程。

线性 DNA 模板

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）。请注意：最后的洗脱应使用无核酸酶水。可适当调整模板材料的最终浓度，保证蛋白质产量。体外蛋白表达试剂盒（线性模板）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。

九、使用说明

建议总反应体积 10 μL 。各组分的添加顺序可参照表 3。想了解更多关于体外蛋白表达实验的信息，请查看表 4 的实验流程中可优化的参数。

1. 将培养箱或水浴锅预热到 29 $^{\circ}\text{C}$ 。
2. 将 CFPE Master Mix (EC) 和 T7P-GFP Positive Control 从 -80°C 中取出，置于冰上直至完全解冻。
注意：1) 使用前组分需一直放在冰上。
2) 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 (EC) 加入到离心管。
5. 将 1 μL 的 T7P-GFP Positive Control 加入到阳性对照管中。阳性对照质粒的最终浓度为 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。或将 1 μL 的质粒 / 线性模板加入到离心管中，质粒 / 线性模板的最终浓度为 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。
注意：1) 操作时避免产生气泡。
2) 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 (EC) 充分混匀。
6. 阴性对照：将 9 μL CFPE Master Mix (EC) 加入到离心管，加入 1 μL 的 Nuclease-free water。
7. 每个离心管的终体积为 10 μL 。
8. 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。例如，6 次反应 ($6 \times 10 = 60 \mu\text{L}$)，制备 63 μL 的总体积。
9. 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。
10. 将反应体系置于培养箱、恒温金属浴或者水浴锅，在 29 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 16 小时。
11. 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。

表 3：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，此反应体系同样适用于线性模板

组分	阳性对照 / 模版	多个反应（如：6 个）	阴性对照
CFPE Master Mix (EC)	9 μ L	56.7 μ L	9 μ L
T7P-GFP Positive Control	1 μ L	6.3 μ L	-
Nuclease-free water	-	-	1 μ L
总体积	10 μ L	63 μ L	10 μ L

十、可优化的反应参数

基于上述实验流程，每个体外蛋白表达实验可能存在需要优化的参数。根据不同的应用及目的蛋白的特性，可优化的参数见表 4。

表 4：实验流程中可优化的参数

参数	优化方案
反应温度	25 °C~30 °C（较低的温度有利于蛋白产出）。
反应时间	30 分钟到 16 小时以上。反应通常在 5~10 分钟内开始。
反应所需的空间	为了获得更高产量的蛋白，反应体系应该建立在充足的空间中。例如，在 1.5 mL 或 2 mL 的离心管中建立 10 μ L 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。例如，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/ μ L。
模板类型	体外蛋白表达试剂盒（线性模板）包含 CFPE Master Mix (ECL)，适用于线性和质粒 DNA 模板。
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	根据我们的测试，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。

十一、常见问题分析及解决

表 5：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/ μ L。
	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 μ L 的反应。
	模板设计不当	如果 N 端或 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。 如果没有使用标签，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物。除了 DNA 模板之外，可能还需要添加助折叠蛋白或其他试剂。 为了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 。



保定米奇生物科技有限公司

Mich Scientific Co., LTD

电话：0312-5905689

网址：www.michlab.cn