派泊生物科技™
PePBIOTECH

PePExpress™

无细胞蛋白表达操作说明手册

目　录

1、产品介绍

2、试剂盒型号及组成

3、组分保存方法及注意事项

4、实验方案及注意事项

5、参考实例

6、常见问题与解决方案

7、**piCFPS-*gfp*** 载体信息

上海派泊生物科技

（2023 年 10 月）

1、产品介绍

PePExpress™ 为无细胞蛋白表达试剂盒，以细胞提取物为基础，辅以蛋白表达所需元件及辅因子，实现从 DNA 到目标蛋白的快速合成。本产品具有反应条件可控、反应速率快、蛋白产量高、产物易分离、无细胞毒害作用等诸多优点，适用于多种蛋白的体外表达，蛋白产量可达 0.2-1.5 mg/mL。

2、试剂盒型号及组成

2.1 试剂盒型号

EC010 S/L　　无细胞蛋白表达基础试剂盒

EC011 S/L　　无细胞蛋白表达增强型试剂盒 I

（适用于基础试剂盒表达后可溶性差的蛋白）

EC012 S/L　　无细胞蛋白表达增强型试剂盒 II

（适用于试剂盒 I 难表达的蛋白）

EC020 S/L　　无细胞蛋白表达增强型试剂盒 III

（适用于表达含二硫键蛋白）

以上试剂盒适用于含 T7 启动子的 DNA 模板（质粒或线性模板）。

2.2 试剂盒组成

表 1、试剂盒组分

Components	S (50 rxns)	L (100 rxns)
PePExpress™ Salt Mix Solution	215 μL	430 μL
PePExpress™ Cell Extract	200 μL	400 μL
PePExpress™ piCFPS-*gfp* (200 ng/μL)	20 μL	20 μL
PePExpress™ Nuclease-Free Water	350 μL	700 μL

3、组分保存方法及注意事项

3.1 PePExpress™ Salt Mix Solution 于-20℃保存，出现少量沉淀是正常现象，请使用前涡旋混合均匀。

3.2 PePExpress™ Cell Extract 于-80℃保存，使用时在冰上静置至融化，避免反复冻融（首

次使用于冰上融化后以 50 μL 每管分装于无酶离心管，液氮速冻后-80℃冻存）。

3.3 PePExpress™ piCFPS-*gfp* 于-20℃保存，可转化大肠杆菌宿主进行质粒扩繁，用于无细胞表达的阳性对照或表达模板构建。

3.4 其他非必需组分（不包含在试剂盒中，需自备）：

1）氧化型谷胱甘肽（GSSG）和还原型谷胱甘肽（GSH），用于 EC020 试剂盒中表达含二硫键目的蛋白；

2）蛋白酶抑制剂，用于表达短肽等易被蛋白酶降解的产物；

3）核酸酶抑制剂，用于稳定表达模板和转录产物；

4）表达特定目的蛋白所需的其他辅因子，如金属离子等。

4、实验方案及注意事项

4.1 实验流程概览

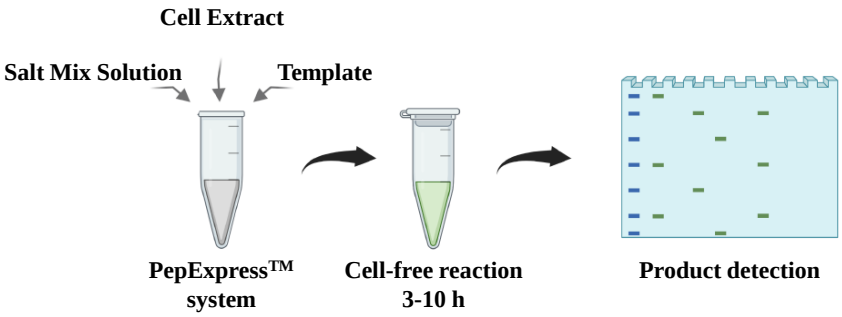


图 4.1 无细胞蛋白表达流程示意图。

4.2 表达模板构建

4.2.1 质粒模板：含有 T7 启动子的表达载体/质粒均可作为本试剂盒的表达模板，或将目标基因构建至试剂盒提供的载体 piCFPS 上，具体克隆方案如下：

1）选用限制性内切酶 NdeI 和 SalI 酶切质粒 piCFPS-*gfp*，切胶回收载体骨架片段（不包含纯化标签），目的基因片段经 NdeI 和 SalI 酶切后同骨架片段经 T4 连接酶连接；

2）选用同源重组方法构建表达模板，同源重组引物序列如下：

正向引物 (5’-3’)：AAGAAGGAGATATACATATG

反向引物 (5’-3’)：TTTGTTAGCAGCCGGTCGAC

3）验证及测序用引物：推荐使用通用引物 T7 启动子/T7 终止子序列，或者自行设计引物。

4.2.2 线性模板：线性模板包括 T7 启动子上游序列-T7 启动子-目的基因-T7 终止子-T7 终止

子下游序列，可以直接从质粒模板上扩增获得，也可以通过融合 PCR 等方法获得。建议增加线性片段纯化步骤以去除相关酶和盐离子，并适当调整体系中模板浓度，适当添加核酸酶抑制剂。

4.2.3 RNA 模板：RNA 模板需包含相应的核糖体结合位点，纯化去除相关酶和盐离子，适当调整体系中模板浓度，并添加 RNA 酶抑制剂。

4.3 无细胞蛋白表达反应体系配制

表 2、无细胞蛋白表达反应体系

	Sample	Positive control	Negative control
Salt Mix Solution	4.3 μL	4.3 μL	4.3 μL
Cell Extract	4 μL	4 μL	4 μL
Template	200 ng*	--	--
piCFPS-*gfp* (200 ng/μL)	--	1 μL	--
Other Factor	If needed	If needed	If needed
Nuclease-Free Water	Up to 15 μL	Up to 15 μL	Up to 15 μL

冰上配制如上反应体系至 1.5 mL 无酶离心管中（15 μL 为一个标准反应单位），反应体系混合均匀后恒温 30℃反应 3-10 h。*每 15 μL 反应中，推荐质粒添加量为 200 ng（即质粒终浓度为 13.3 ng/μL）；质粒添加量，也可根据质粒大小做适当优化调整，每 15 μL 反应中质粒添加范围为 100-400 ng。

【注】

1）为避免核酸酶对反应的干扰，建议选择无酶实验耗材，用无酶去离子水制备表达模板，并保证实验操作台的整洁干净。

2）标准反应可在 1.5 mL 无酶离心管中进行，也可以选择其他反应容器，如 96 孔板等，保证体系的均一性。

3）常用恒温仪器如恒温水浴锅、恒温培养箱、恒温混浴仪等均可满足反应要求。

4）反应温度和时间可根据目的蛋白进行调整，如大分子量蛋白，可优化反应温度并适当延长反应时间。

5）EC020 型号试剂盒用于表达含二硫键目的蛋白，反应体系中建议添加 GSSG（5 mM）和 GSH（1.25 mM），添加浓度和比例可根据目的蛋白进行优化调整。

4.3 无细胞蛋白表达产物检测

无细胞表达的目的蛋白建议经 Western-Blot 检测，未纯化且低表达量的目的蛋白经 SDS-PAGE 检测条带不易分辨。可将反应离心后取上清检测，以判断目的蛋白表达的可溶情况。试剂盒中提供的阳性对照模板 piCFPS-*gfp* 产物为 GFP，可肉眼观察绿色荧光判断是否表达，或通过酶标仪等检测荧光强度。

4.4 无细胞蛋白表达产物纯化

反应结束后将反应体系离心（20000 g，4℃，离心 0.5-1 h），取上清，此后蛋白纯化方法同体内蛋白表达纯化一致。如后续选择亲和层析纯化，则根据目的蛋白融合的纯化标签选择亲和层析填料，并根据反应体积选择纯化方案（如层析柱或磁珠等）。

5、参考实例

5.1 无细胞表达 GFP

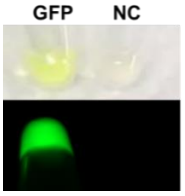
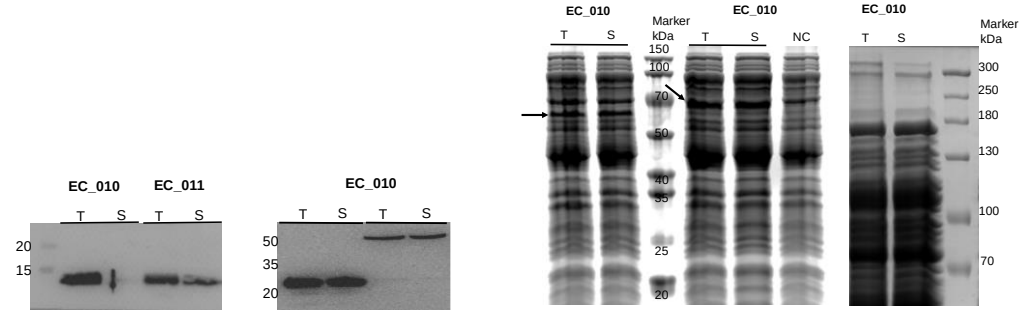


图 5.1 EC010 试剂盒表达 GFP。

5.2 无细胞表达不同分子量的目的蛋白



a. b. c. d.

图 5.2 PePExpress™ 试剂盒表达不同分子量的目的蛋白。a. 短肽，分子量 8.6 kDa，模板质粒 pET28a。b. 目的蛋白分子量分别为 18.2 kDa、42.6 kDa，模板质粒 pET28a。c. 目的蛋白分子量分别为 62 kDa、66 kDa，模板质粒 pET22b。d. 目的蛋白分子量分别为 392 kDa、302 kDa。T 为总蛋白；S 为可溶性蛋白。

5.3 无细胞表达可溶性差目的蛋白

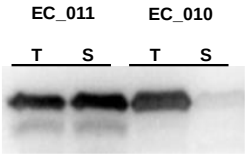


图 5.3 增强型 EC011 试剂盒促进目的蛋白可溶性表达实例。T 为总蛋白；S 为可溶性蛋白。

5.4 无细胞表达含二硫键目的蛋白

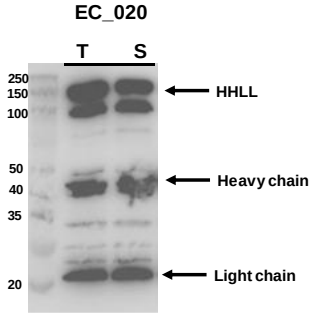


图 5.4 EC020 试剂盒表达含有二硫键目的蛋白实例。T 为总蛋白；S 为可溶性蛋白。

5.5 无细胞表达细胞毒性目的蛋白

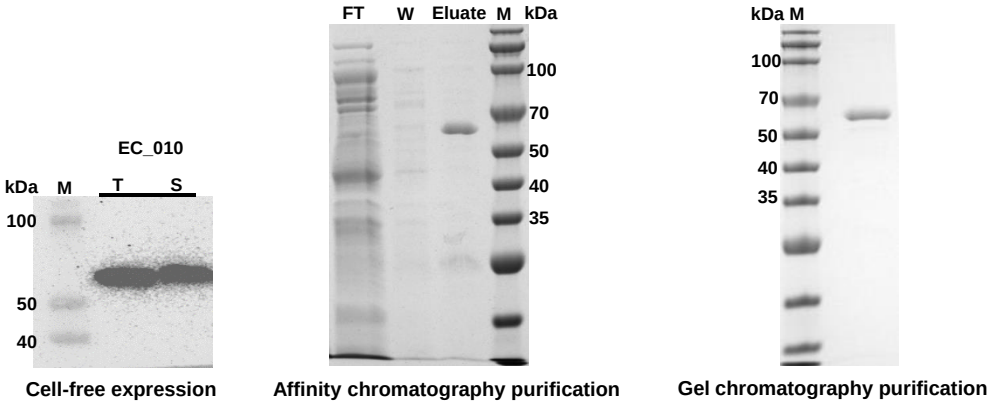


图 5.5 EC010 试剂盒基于线性模板表达、纯化细胞毒性目的蛋白。T 为总蛋白；S 为可溶性蛋白。

6、常见问题与解决方案

6.1 目的蛋白检测不到

若目的蛋白在无细胞体系中产量较低时，通过 SDS-PAGE 的方法不易观察到条带，推荐以下几种解决方案：

1）上样量少，可以增加蛋白上样量；

2）由于没有经过纯化，目的蛋白条带易被细胞提取物中分子量相近的蛋白条带干扰，建议用 Western-Blot 方法检测；

3）目的蛋白表达量少，可提高检测灵敏度如用 Western-Blot 方法检测，或通过条件优化以提高产量，详见 6.3。

6.2 目的蛋白表达可溶性差

若目的蛋白在 EC010 试剂盒中表达可溶性差时，推荐以下几种解决方案：

1）表达模板改造：在表达载体上引入促可溶标签如 SUMO、Trigger Factor (TF)、MBP 等；

2）选用增强型试剂盒 EC011 或 EC012。

6.3 目的蛋白表达量少

若目的蛋白在试剂盒中表达量少，推荐以下几种优化方案：

1）质粒抽提试剂盒优化：经不同质粒抽提试剂盒得到的质粒浓度和纯度等均有差异，会在一定程度上影响目的蛋白的表达和产量，建议尝试不同品牌的质粒抽提试剂盒；

2）表达模板优化：将目的蛋白基因克隆至试剂盒所提供的阳性质粒骨架上（piCFPS），骨架信息参见 7；

3）模板浓度优化：15 μL 的体系中模板浓度为 200 ng，提高模板浓度在一定程度上可以增加目的蛋白产量；

4）表达温度和时间优化：根据目的蛋白的大小和复杂程度，可以对表达体系的反应温度和时间进行优化以提高产量，如短肽的表达推荐 30-37℃，3-6 h，大于 100 kDa 蛋白的表达推荐 30℃，16-20 h，或 20-25℃，20-24 h，低温长时间表达建议适当扩大反应体系并增强密封，以免体系液体蒸发；

5）T7 RNA 聚合酶优化：试剂盒中所含 T7 RNA 聚合酶可以满足常规蛋白表达，额外补充 T7 RNA 聚合酶在一定程度上可以提高部分目的蛋白的表达量；

6）核酸酶抑制剂优化：核酸酶抑制剂可降低表达模板及转录产物被核酸酶降解，可以在一定程度上提高目的蛋白的表达量；

7）蛋白酶抑制剂优化：蛋白酶抑制剂可以降低表达产物被蛋白酶降解，特别是短肽等目的蛋白。

6.4 表达体系扩大化

为了提高目的蛋白的绝对表达量，可将无细胞反应体系扩大化，推荐以下方案：

1）根据标准反应体系相应提高反应体积，调整反应容器，建议 15-50 μL 体系在 1.5 mL 离心管中进行，50-200 μL 体系在 2 mL 离心管中进行，1-5 mL 体系在 50 mL 离心管中进行，50 μL 以上体系建议在可振荡恒温设备中反应，以保证反应组分的均一性和一定的溶氧；

2）进行半连续或连续反应，通过补充表达模板、能量体系等反应组分提高恒定反应体积中目的蛋白的表达量。详情可咨询后续推出的半连续、连续反应体系试剂盒。

7、piCFPS-*gfp* 载体信息

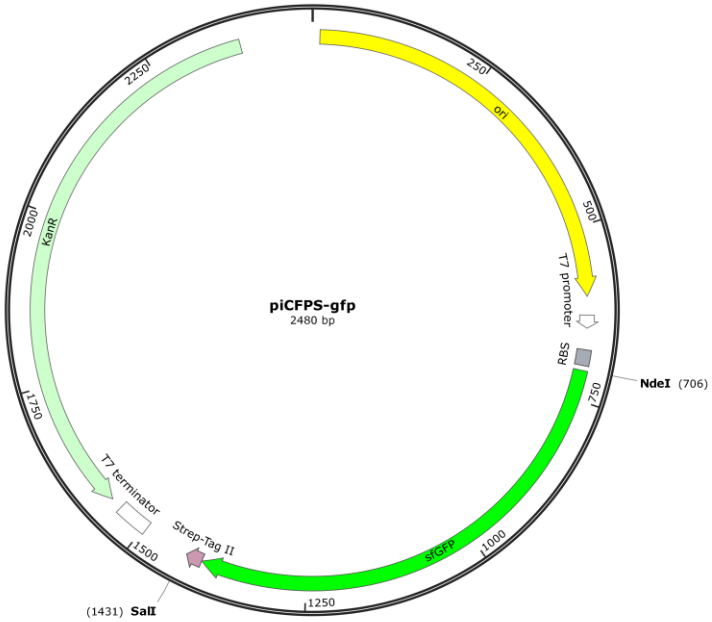


图 7.1 piCFPS-*gfp* 载体图谱。