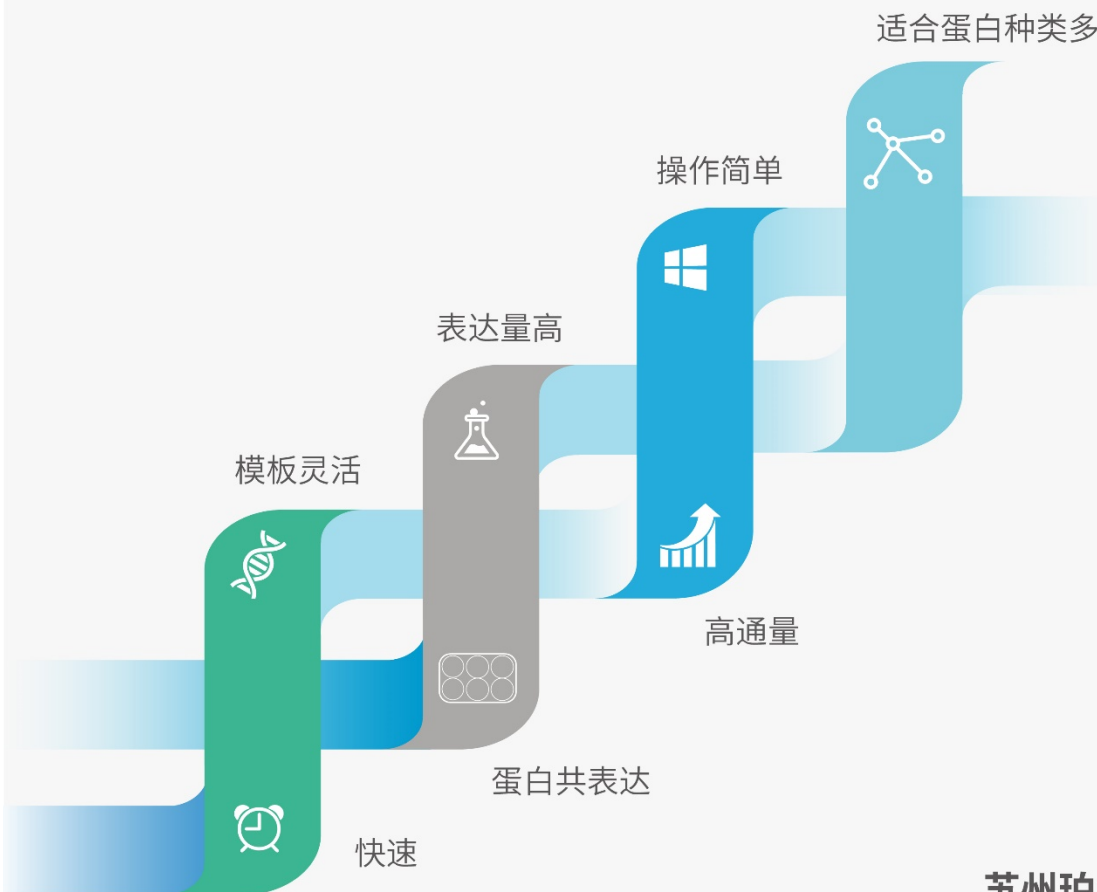




珀罗汀生物
PLD TECHNOLOGY

PLD无细胞蛋白表达试剂盒

大肠杆菌表达系统



苏州珀罗汀生物技术有限公司

修订日期：2024年2月23日

目录

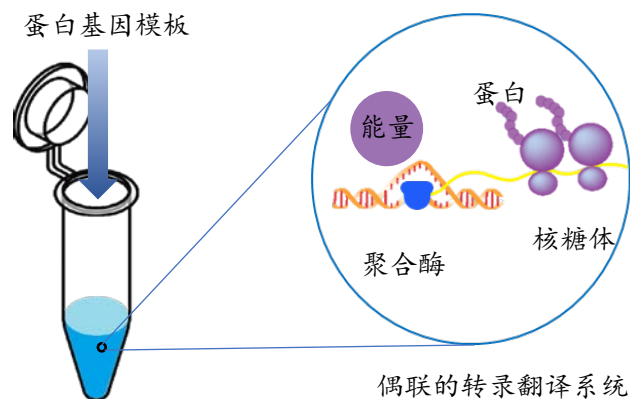
无细胞表达系统简介

概念	2
示意图	2
优势	2
大肠杆菌无细胞表达系统	3
组成部分	3
注意	3

产品说明

产品简介	5
产品优势	5
产品清单	5
储存建议	5
安全信息	6
质粒图谱	6
注意事项	6
使用说明	8
无细胞反应快速指南	9
实验例	13
问题排除	13
附录：线性模板构建手册	16

概念：无细胞蛋白表达系统是一种以外源 mRNA 或 DNA 为模板，在细胞抽提物或蛋白表达所必须的酶和辅因子重构体系中利用氨基酸和能量合成蛋白质的体外反应系统。无细胞蛋白表达系统包含了蛋白表达所需要的全部模板、分子机器、底物和能量。其不受细胞自身代谢和细胞封闭环境限制，能够在体外快速、大量表达蛋白。常见的无细胞蛋白表达系统有大肠杆菌系统、昆虫细胞裂解液系统、麦芽胚系统、兔网织红细胞系统等。



无细胞蛋白表达示意图

无细胞表达系统的优势：

- 反应体系小，能同时平行合成多种不同的蛋白质；
- 可添加非天然氨基酸或同位素标记氨基酸，表达特殊蛋白；
- 无细胞结构限制，可用于生产对宿主有毒害作用的外源蛋白；
- 反应周期短，能满足高通量配体筛选和蛋白质组学的研究需要；
- 无需质粒转化、细胞培养、收集、破碎和离心等，极大地提高了工作效率；
- 对于多次跨膜或由于疏水性强导致的普通细胞系表达困难的蛋白有显著改善；
- 开放的反应体系，便于改变各项反应条件，有利于调控基因的转录，蛋白质的合成和翻译后修饰，避免包涵体的形成。

大肠杆菌无细胞表达系统

大肠杆菌无细胞蛋白表达系统是目前应用最广泛的无细胞蛋白表达系统,因其遗传背景清楚,目的基因表达水平高,培养周期短,效率高,成本低,抗污染能力强,易于放大,并且可以适用于多种属蛋白的表达,因此广泛应用于蛋白质互作、高通量筛选、基因电路等前沿研究领域。使用高效的转录和翻译耦合反应在试管内生产出具有活性的重组蛋白。高效快速无细胞合成系统消除了传统细胞内蛋白生产过程中耗时耗力的步骤,包括转化、细胞培养和表达优化等。短短几小时内,这种大肠杆菌的体外表达系统即可以生产出高产量、高质量的蛋白质,并且无论你使用环状质粒 DNA 用于合成蛋白质,快速表达筛选或者下游结构或功能分析,都能极大的简化蛋白表达过程。

PLD 无细胞体外蛋白表达系统的组成部分

PLD 无细胞体外蛋白表达试剂盒提供一种制备重组蛋白的方法,可轻松进行检测和纯化。该试剂盒提供的表达系统主要包含:

- 优化的大肠杆菌提取物,增加了 DNA 转录和翻译过程中结构的稳定性,增加可溶性蛋白的产量;
- 优化的反应缓冲液,通过 ATP 再生系统持续为蛋白质合成提供能量;
- 优化浓度比例的氨基酸,为蛋白质合成提供充足的底物供应;
- 含 GFP 基因的优化表达载体, GFP 作为阳性对照可以直观地观测蛋白表达结果。

注意: 使用本试剂盒前

- ① 如果您使用本试剂盒提供的质粒 DNA 模板构建目的基因表达载体,为了正确表达,所有模板必须包含 T7 启动子、起始密码子和目的基因上游的原核生物核糖体结合位点(RBS);
- ② 如果您设计自己的表达载体,我们建议生成一个包含以下元素的 DNA 模板(如下图所示);

- 目的基因位于 T7 启动子和核糖体结合位点 (RBS) 的下游，必须包含一个 **ATG 起始密码子** 和一个终止密码子，在 RBS 和 ATG 起始密码子之间的 **7-9 nt** 的序列，以获得目标蛋白的最佳翻译效率；这个顺序不必是特定的；
- 目的基因 T7 启动子上游含有至少 **6-10 个核苷酸 (nt)** 的序列，可有效结合启动子 (线性 PCR 产物所必需的)；这个顺序不必是特定的，跟随 T7 启动子的序列包含至少 15-20 nt，形成潜在的茎环结构；
- 一个位于目的基因下游 4- 100nt 的 T7 终止子可以有效地终止转录并保持信息的稳定性。



一、产品简介：

本试剂盒能够通过质粒或线性模板，实现目的蛋白质的快速、高效表达，试剂盒采用转录和翻译偶联的方法，通过“一锅式”反应表达目的蛋白。试剂盒中提供的无细胞反应体系除目的蛋白基因外，含有体外转录和翻译所需的全部酶、能量、氨基酸、核苷酸、无机盐等，操作简便，表达效率高。

二、产品优势：

- 快速：最快只需要 1 小时即可表达目的蛋白；
- **模板灵活：支持线性模板、质粒模板以及 PCR 产物；**
- 表达量高：最高可实现 3mg/mL 以上产率的蛋白制备；
- 蛋白共表达：可在同一反应中进行多目的蛋白的同时表达；
- 操作简单：一步反应，仅需将反应组分与 DNA 模板混合即可制备蛋白；
- 高通量：反应也可在 96 孔板中进行，当检测到阳性表达后，可进行体系放大；
- 适用蛋白种类多：可表达各种类型的蛋白，包括富含二硫键的蛋白、膜蛋白等。

三、产品清单：

试剂	包装			运输	储存
体积	300uL	1mL	5mL	干冰运输	-80℃
组分 A	6 rxns	20 rxns	100 rxns		
组分 B	6 rxns	20 rxns	100 rxns		
阳性对照					
质粒 (PC)	2 μg	4 μg	10 μg		

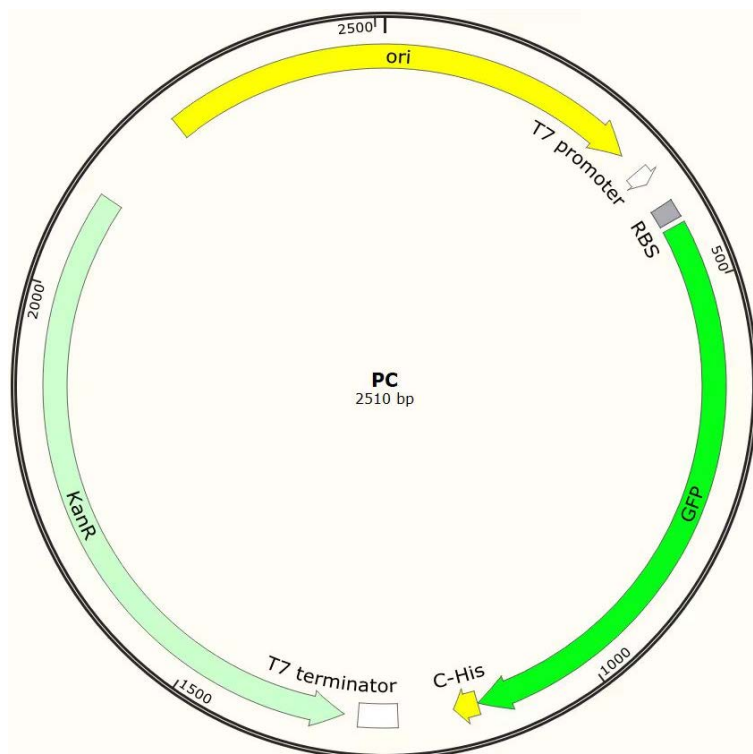
四、储存建议

试剂盒采用干冰运输，用户开封后，请将无细胞蛋白表达反应组分置于 -80°C 冷冻长期储存。建议现用现配，如需溶解后分装试剂，推荐分装后用液氮冷激再置于 -80°C 冰箱储存备用，避免反复冻融。

五、安全信息：

在处理此产品时，应给与充分的注意。我们建议所有慎用试剂盒产品的用户遵守实验室安全操作手册，或其他适用的指导方针。具体来说，在接触化学品时，一定要穿合适的实验服，佩戴一次性手套、口罩和护目镜。本产品仅限专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断和治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅。

六、对照质粒图谱：



起始密码子上游序列 5'
 → 3':
 ACTTT AAGAA GGAGA
 TATAC AT**ATG**
 终止密码子下游序列
 5'→3' : **TGAGT** CGACC
 GGCTG CTAAC AAAGC

七、注意事项：

- ① 本试剂盒基于原核表达体系开发，可表达原核生物蛋白，包括细菌、病毒以及含有二硫键的蛋白质，也可表达不需进行翻译后修饰的真核生物蛋白；
- ② 本试剂盒优选 T7 启动子作为转录启动元件；
- ③ 在进行实验时，一定要用移液器完全混匀后使用，并尽量避免气泡产生；
- ④ 影响蛋白质产量的因素包括：
 - 蛋白质的大小；
 - DNA 模板的质量；
 - 目的基因的序列；
 - 目的基因在 DNA 模板上相对于 T7 启动子和 RBS 结合位点的位置；

使用最优配置和纯化的 DNA 模板，蛋白质的大小和序列会根据你感兴趣的基因而有所不同。由这两个因素引起的蛋白质产量的任何变化都需要经过实验来优化表达条件。

- ⑤ 如果需要表达膜蛋白，推荐选用 PLDK002。

八、使用说明：

8.1 模板制备：本试剂盒可使用环状或线性 DNA 作为表达模板，蛋白表达所需的转录翻译元件信息参照前述无细胞蛋白简介部分注意第二条。

以环状质粒作为表达模板：可使用含 T7 启动元件的质粒作为载体骨架制备质粒表达载体，以质粒 DNA 作为无细胞蛋白表达模板；

以线性 DNA 作为表达模板：可采用重叠 PCR 方法，在目的基因上下游引入 T7 转录表达元件，制备线性 DNA 表达模板。

注意：

1. 推荐以 pID 和 pJL1 质粒为骨架构建表达模板，含有乳糖操纵子的 pET 系列质粒不适用于本试剂盒，如果您已有 pET 系列质粒，可以考虑使用同源重组方法将基因重组到 PC 质粒上构建质粒表达模板或者参照本说明书附录“CFPS 线性表达模板构建方法”部分构建线性表达模板来进行反应；

2. 无细胞蛋白表达体系对核酸酶十分敏感，部分质粒提取试剂盒可能会有核酸酶残留，可考虑用 PCR 纯化试剂盒来去除核酸酶的残留。

8.2 无细胞反应前的准备：

- 根据反应体系计算所需组分 A 和组分 B 的使用量，将所用的反应试剂置于冰上备用；（注意实验应在冰上操作，防止试剂失效；组分 A 和组分 B 应避免反复冻融；）
- 可将 1 管组分 A 和 1 管组分 B 完全混合，然后根据需要分装后用液氮处理置于-80℃冰箱储存备用；（如按 37 μL/管分装，可用于 50 μL 反应体系）
- 无细胞蛋白表达反应对核酸酶敏感，操作过程请全程佩戴手套、口罩，并采用去核酸酶的试剂、容器和移液器吸头。

8.3 无细胞反应建立操作步骤：

1. 按参考的反应体系添加各试剂至反应容器中，移液器吹吸混合均匀，避免剧烈震荡；
2. 将反应容器放置在普通摇床（推荐参数：180rpm，25℃）或桌面式恒温

混匀仪（如 Thermomixer，推荐参数：600rpm，25°C）中进行蛋白合成反应，通常反应 2-16 小时即可获得最大的目的蛋白产率，大多数蛋白在 6 至 8 小时内就可以完全表达，但反应 16 小时可能会增加某些蛋白的表达。每个蛋白的最佳表达时间必须由具体情况来确定。推荐首次反应过夜进行（16h）以保证目的蛋白完全表达。

8.4 推荐反应体积与对应容器：

反应体系可根据实际需要按比例放大或缩小

试剂	用量
组分 A	20.5 μ L
组分 B	16.7 μ L
DNA 模板	终浓度 20ng/ μ L
ddH ₂ O	补至 50 μ L
总反应体积	50 μ L

推荐反应体积及对应反应容器

反应体积	反应容器
50 μ L	96 孔板
100 μ L	48 孔板
200-300 μ L	24 孔板
500-1000 μ L	6 孔板
10-100 mL	250mL 锥形瓶

注：推荐反应容器孔板为平底细胞培养板，其他反应容器如深孔板反应效率无法保证。

九、无细胞反应快速指南

➤ 反应液的准备

- 1: 将所需用到的试剂放在冰上静置至完全融化;
- 2: 可将组分 A 和组分 B 混合均匀, 根据需要进行分装, 剩余的试剂用液氮速冻后置于-80 度冰箱储存, 避免反复冻融;
- 3: 按参考的反应体系添加各试剂、移液器吹吸混合均匀, 避免剧烈震荡; (建议使用的模板终浓度为 10-40 ng/ μ L)

➤ 反应的启动和进行

- 1: 将混合好的反应液至于设备中反应 2-16 小时, 一般推荐 6h 反应时间, 可根据需求适当缩短或延长反应时间。推荐复杂蛋白首次反应过夜进行 (16h) 以保证目的蛋白完全表达。

(建议使用恒温混匀仪, 25°C, 600rpm, 或者使用摇床 25°C, 180rpm)

- 2: 离心 (4°C, 10000g, 2min)

- 3: 取上清进行鉴定

➤ 蛋白表达结果鉴定

本试剂盒采用 GFP 绿色荧光蛋白作为阳性对照, 可通过使用具有荧光信号读取功能的仪器 (酶标仪、荧光显微镜等) 检测或直接肉眼观测反应液荧光, 进行 GFP 表达鉴定 (ex/em: 485/535 nm)。对于目的蛋白的表达结果可采用聚丙烯酰胺凝胶电泳、Western 免疫印迹分析等方法进行鉴定。

➤ 蛋白表达结果小量纯化鉴定操作示例

注: 该方案所使用到的试剂需自行购买, 本试剂盒内不予提供。

一. 纯化

1. 取反应上清: 反应后样品 200 μ L, 12000g, 2min, 4 度离心, 取上清备用;

2. 准备 Ni 珠: 取 50 μ l Ni 珠, 用 50 μ l 的 1*PBS 洗 2 次; (离心条件: 6000g, 30s)

3. 孵育: 1.5mL 离心管中加 【 50 μ l Ni 珠, 700 μ l PBS, 250 μ l 反应上

清，4 μ l 500mM 咪唑洗脱液（即咪唑终浓度为 2mM）】4 度孵育 2h；（旋转混合仪缓慢摇动）

4. 洗涤：用 1mL ，5mM 的咪唑洗涤液洗 3 次；（离心条件：6000g，30s ）

5. 洗脱：用 0.1mL ，500mM 的咪唑洗脱液洗脱 1 次；（离心条件：6000g，30s ）

注：所有 Ni 珠洗涤和洗脱操作均使用涡旋仪震荡 2 到 3 次，每次 2-3s，其余时间置于冰上，保持低温；

6. Buffer 配方

Buffer 名称	Buffer 配方
1*PBS	10 mmol/L Na ₂ HPO ₄ ; 1.75 mmol/L KH ₂ PO ₄ ; 137 mmol/L NaCl; 2.65 mmol/L KCl; pH 7.4
500mM 咪唑洗脱液	50 mmol/L NaH ₂ PO ₄ ; 300 mmol/L NaCl; 500 mmol/L imidazole; pH 7.4
5mM 咪唑洗涤液	50 mmol/L NaH ₂ PO ₄ ; 300 mmol/L NaCl; 5 mmol/L imidazole; pH 7.4

二. 表达鉴定

1. 制样

洗脱样品制样：20 μ l 洗脱液+5 μ l 蛋白上样缓冲液；95 $^{\circ}$ C，5min；

上清样品制样：2 μ l 上清液+18 μ l PBS+5 μ l 蛋白上样缓冲液；

95 $^{\circ}$ C，5min；

沉淀样品制样：200~300 μ l 反应体系的沉淀，用 200 μ l PBS 重悬洗涤

离心后，用 100 μ l PBS 重悬，取 20 μ l+5 μ l 蛋白上样缓冲液；95 $^{\circ}$ C，

5min；

2. SDS-PAGE

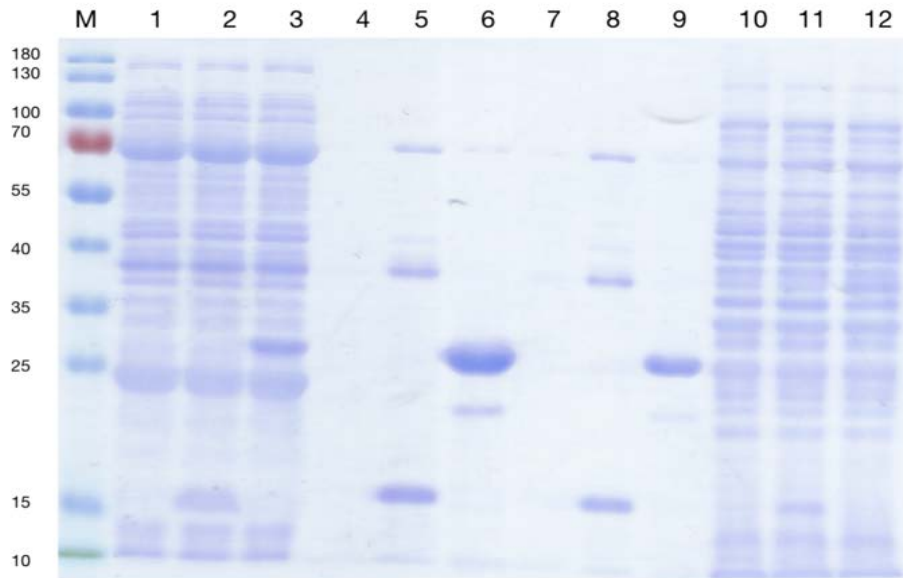
电泳上样量：洗脱样品制样后 10 μ l；反应上清样品制样后 10 μ l；

沉淀样品制样后 5 μ l；

电泳条件：12%SDS-PAGE 胶，100V，1.5h；

3. Western Blot

三. 鉴定结果示例



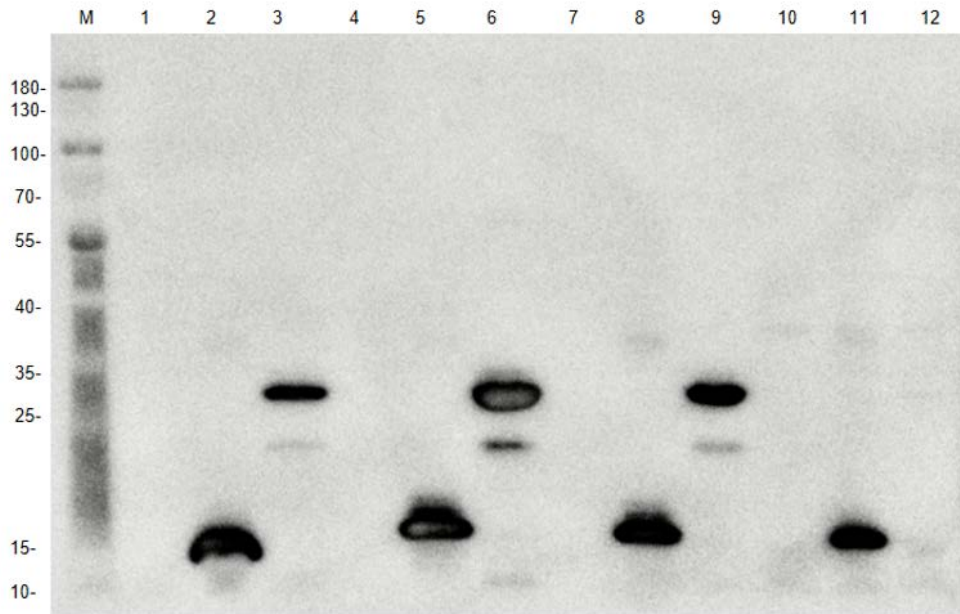
泳道1: 空白反应上清
 泳道2: 样品反应上清
 泳道3: 阳性反应上清

泳道4: 空白洗脱
 泳道5: 样品洗脱
 泳道6: 阳性洗脱

泳道7: 空白洗脱后Ni珠
 泳道8: 样品洗脱后Ni珠
 泳道9: 阳性洗脱后Ni珠

泳道10: 空白反应沉淀
 泳道11: 样本反应沉淀
 泳道12: 阳性反应沉淀

图 1 亲和纯化 SDS-PAGE 结果

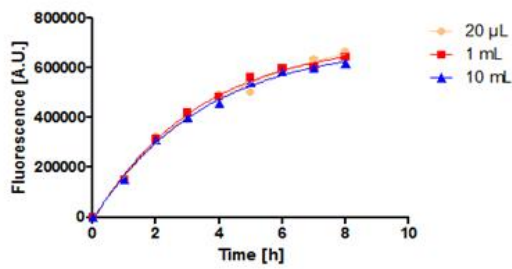


泳道1: 空白反应上清 泳道4: 空白洗脱 泳道7: 空白洗脱后Ni珠 泳道10: 空白反应沉淀
 泳道2: 样品反应上清 泳道5: 样品洗脱 泳道8: 样品洗脱后Ni珠 泳道11: 样本反应沉淀
 泳道3: 阳性反应上清 泳道6: 阳性洗脱 泳道9: 阳性洗脱后Ni珠 泳道12: 阳性反应沉淀

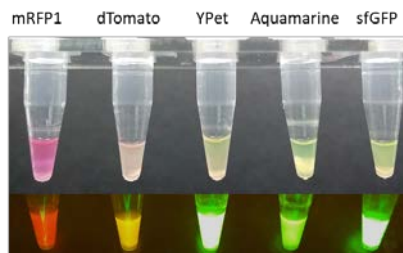
图 2 Western Blot 结果

实验例:

对照 GFP 质粒随时间蛋白表达量变化曲线



表达不同荧光蛋白基因



可见光

荧光

十、问题排除：可能出现的问题及解决方法

问题	原因	解决方法
目的蛋白活性低	不正确的蛋白折叠	<ul style="list-style-type: none"> • 适当降低反应温度； • 添加分子伴侣。
	合成的目的蛋白需要进行翻译后修饰	本试剂盒是原核生物表达系统，不含翻译后修饰组分，需要确保所表达蛋白的翻译后修饰不影响蛋白活性。
	合成的目的蛋白需要辅因子才能具有完整的活性	在蛋白质合成反应中加入所需的辅助因子。
目的蛋白产量低或无表达（阳性对照有蛋白生成）	DNA 污染 <ul style="list-style-type: none"> • 被乙醇污染 • 被 RNase 污染 	<ul style="list-style-type: none"> • 准备新的 DNA 模板，注意去除沉淀后多余的乙醇等； • 在制备 DNA 时，戴上手套和口罩并使用无 RNase 的试剂。
	DNA 模板量低	建议使用模板终浓度 10-40 ng/μL
	DNA 模板及标签需要优化	<ul style="list-style-type: none"> • 确保 ATG 起始密码子在合适的表达位置，阅读框没有移码； • 编码序列复合原核系统的密码子偏好性； • 融合标签种类和位置（N-端或 C-端）可能会影响 RNA

问题	原因	解决方法
		结构和翻译水平。更换融合标签或改变标签位置。
	目的蛋白过大	<ul style="list-style-type: none"> 蛋白质产量可能随着蛋白质分子的增大而降低，可尝试优化反应温度，补加氨基酸和 ATP 等。
	目的蛋白聚集沉淀	<ul style="list-style-type: none"> 表达太快来不及正确折叠，可尝试降低反应温度； 在反应中添加分子伴侣； 对于疏水性蛋白，可添加适量温和洗涤剂如吐温-20 等到反应液中。
在聚丙烯酰胺凝胶上观察到多条疑似无细胞表达出来的条带	SDS- PAGE 样品缓冲液中 SDS 不足	重新配置新的 SDS- PAGE 样品缓冲液
	ATG 密码子在类似 RBS 的序列中	<ul style="list-style-type: none"> 检查你的基因序列，寻找与蛋氨酸适当间距的 RBSs； 用点突变替换蛋氨酸或改变 RBS 序列。
在聚丙烯酰胺凝胶上观察到条带有拖尾现象	蛋白上样量过多	减少凝胶上的蛋白上样量
	凝胶不干净	<ul style="list-style-type: none"> 重新配置凝胶； 在上样之前，稍微冲洗一下凝胶
	蛋白质合成反应中存 在乙醇	确保在 DNA 纯化过程中去除残留的乙醇。
	预制胶过期	不要使用过期的预制胶
阳性对照反应无荧光	试剂失活	<ul style="list-style-type: none"> 试剂储藏于-80℃冰箱中；

问题	原因	解决方法
		<ul style="list-style-type: none">稀释后的试剂应分装后用液氮冷激再置于-80℃冰箱储存备用，避免反复冻融。
	试剂被 RNase 污染	在实验操作过程中，请戴上手套和口罩并使用无 RNase 的移液器吸头及溶剂处理样品。

附录：线性表达模板构建方法

一. 简介:

PLD无细胞蛋白表达试剂盒是一种简单快速的蛋白体外表达试剂盒，将线性模板或质粒加入到无细胞蛋白表达体系中，目标蛋白在数小时内即可表达出来。

线性模板准备：利用PCR的方法就可以在目的基因两侧加入转录和翻译所需的因子，不需要繁琐的载体构建过程，适用于蛋白的高通量合成和筛选。通常，原核表达模板需包含以下元件：T7启动子、核糖体结合位点(RBS)以及转录终止子。目的基因位于T7启动子和RBS的下游，必须包含一个ATG起始密码子和一个终止密码子。



二. 使用两步PCR法构建线性表达模板:

本篇提供了一个构建线性表达模板的思路，实际操作需根据具体实验进行调整。



Step1

- 表达目的基因所需的线性模板可采用重叠PCR方法构建，即在目的基因上下游引入T7转录表达元件。

- 在第一步PCR，使用普通PCR的方法分别获得5UTR片段，3UTR片段以及目的基因片段，（目的基因片段通过正反向引物在其5'端和3'端分别引入与5UTR和3UTR同源序列）；

- 第二步PCR，使用重叠PCR方法，将上一步获得的5UTR片段，3UTR片段以及目的基因片段拼接成完整的线性表达模板。

Step2





三. 以试剂盒中的阳性对照质粒PC为例，构建线性表达模板：

1. **第一步PCR**：使用PCR的方法分别获得5UTR片段，3UTR片段以及目的基因片段，其中5UTR通常含有T7启动子、核糖体结合位点等表达元件，3UTR通常含转录终止子，目的基因片段通过正反向引物在其5'端和3'端分别引入与5UTR和3UTR同源序列；

◆ 扩增目的基因片段的引物设计：

正向引物：Protein-f，引物5'端为27nt与5UTR重叠的序列（黄色部分），在此后接18nt（可根据实际需要增加或减少）与目的基因5'端重合的序列；（目的蛋白从ATG开始翻译）



反向引物：Protein-r，引物5'端为21nt与3UTR重叠的序列（黄色部分），在此后接18nt（可根据实际需要增加或减少）与目的基因3'端重合的序列（包含终止密码子）；



试剂准备：

- 阳性对照质粒PC；
- PCR Mix：高保真酶，例如PrimeSTAR® Max DNA Polymerase；
- 引物：

编号	序列
5UTR-f	5'-GGACAGGTATCCGGTAAGCG-3'
5UTR-r	5'-ATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTT-3'
3UTR-f	5'-GTCGACCGGCTGCTAACAAAG-3'
3UTR-r	5'-TGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGAT-3'
Protein-f	5'-GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT ATG XXX XXX XXX XXX XXX XXX-3'
Protein-r	5'-CTTTGTTAGCAGCCGGTCGAC TTA XXX XXX XXX XXX XXX XXX -3'

◆ 制备5'UTR片段:

① 5'UTR片段的PCR体系 (以100 μ L体系为例, 可根据实际需要按比例增加或减少):

成分	添加量	参考浓度
酶: PrimeSTAR Max Premix (2X)	50 μ L	1 \times
正向引物: 5'UTR-f (10 μ M)	2 μ L	0.2~0.4 μ M
反向引物: 5'UTR-r (10 μ M)	2 μ L	0.2~0.4 μ M
模板 (PC) (10ng/ μ L)	1 μ L	
无菌水	45 μ L	补齐至100 μ L

② 5'UTR片段的PCR程序:

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	98 $^{\circ}$ C	10s	1
变性	98 $^{\circ}$ C	10s	30 cycles
退火	55 $^{\circ}$ C	15s	
延伸	72 $^{\circ}$ C	0.5min (1 min/1000bps)	
延伸	72 $^{\circ}$ C	2min	1
保存	4 $^{\circ}$ C	forever	1

③ 5'UTR片段的回收: PCR反应完成后的, 使用2%~3%的琼脂糖凝胶鉴定, 若目标条带清晰且大小正确, 使用DNA凝胶回收试剂盒进行回收备用;

◆ 制备3'UTR片段:

① 3'UTR片段的PCR体系 (以100 μ L体系为例, 可根据实际需要按比例增加或减少):

成分	添加量	参考浓度
酶: PrimeSTAR Max Premix (2X)	50 μ L	1 \times
正向引物: 3'UTR-f (10 μ M)	2 μ L	0.2~0.4 μ M
反向引物: 3'UTR-r (10 μ M)	2 μ L	0.2~0.4 μ M
模板 (PC) (10ng/ μ L)	1 μ L	
无菌水	45 μ L	补齐至100 μ L

② 3'UTR片段的PCR程序:

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	98°C	10s	1
变性	98°C	10s	30 cycles
退火	55°C	15s	
延伸	72°C	0.5min (1 min/1000bps)	
延伸	72°C	2min	1
保存	4°C	forever	1

③ 3'UTR片段的回收: PCR反应完成后的, 使用2%~3%的琼脂糖凝胶鉴定, 若目标条带清晰且大小正确, 使用DNA凝胶回收试剂盒进行回收备用;

◆ 扩增目的基因片段:

① 目的基因片段的PCR体系
(以100 μ L体系为例, 可根据实际需要按比例增加或减少):

成分	添加量	参考浓度
酶: PrimeSTAR Max Premix (2X)	50 μ L	1 \times
正向引物: protein-f (10 μ M)	2 μ L	0.2~0.4 μ M
反向引物: protein-r (10 μ M)	2 μ L	0.2~0.4 μ M
目的基因模板 (10ng/ μ L)	1 μ L	< 200ng
无菌水	45 μ L	补齐至100 μ L

② 目的基因片段的PCR程序:

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	98°C	10s	1
变性	98°C	10s	30 cycles
退火	55°C	15s	
延伸	72°C	1 min/1000bps	
延伸	72°C	2min	1
保存	4°C	forever	1

③ 目的片段的回收: PCR反应完成后的, 使用适宜浓度的琼脂糖凝胶鉴定, 使用DNA凝胶回收试剂盒进行回收备用;

2. 第二步PCR: 使用重叠PCR方法, 将上一步获得的目的基因片段和5UTR片段, 3UTR片段拼接称完整的线性表达模板。此步所用引物请根据实际使用的5UTR和3UTR选择。

试剂准备:

- 5UTR片段, 3UTR片段以及目的基因片段;
- PCR Mix: 高保真酶, 例如PrimeSTAR® Max DNA Polymerase;
- 引物:

	编号	序列
	5UTR-f	5'-GGACAGGTATCCGGTAAGCG-3'
	3UTR-r	5'-TGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGAT-3'

① PCR体系 (以100 μ L体系为例, 可根据实际需要按比例增加或减少):

成分	添加量	参考浓度
酶: PrimeSTAR Max Premix (2X)	50 μ L	1 \times
正向引物: 5UTR-f (10 μ M)	2 μ L	0.2~0.4 μ M
反向引物: 3UTR-r (10 μ M)	2 μ L	0.2~0.4 μ M
5UTR片段 (20ng/ μ L)	1 μ L	20ng
3UTR片段 (20ng/ μ L)	1 μ L	20ng
上一步PCR产物: 目的基因片段	X μ L	三个片段摩尔比为 5UTR:目的基因: 3UTR=1:3:1
无菌水	X μ L	补齐至100 μ L

② 目的基因片段的PCR程序:

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	98 $^{\circ}$ C	10s	1
变性	98 $^{\circ}$ C	10s	30 cycles
退火	55 $^{\circ}$ C	15s	
延伸	72 $^{\circ}$ C	1 min/1000bps	
延伸	72 $^{\circ}$ C	2min	1
保存	4 $^{\circ}$ C	forever	1

③ 目的片段的鉴定回收: PCR反应完成后的, 使用适宜浓度的琼脂糖凝胶鉴定, 若目标条带清晰且单一可直接用于无细胞蛋白表达, 也可使用PCR回收试剂盒进行回收后备用; 若条带不单一则需使用DNA凝胶回收试剂盒进行回收后, 再以其为模板再次扩增后使用;



苏州珀罗汀生物技术有限公司

苏州工业园区界浦路69号维力医疗科创园1号楼302室

☎ 0512-67900128 ✉ sz_protein@163.com 🌐 www.cellfreeprotein.cn

