

无细胞蛋白表达系统简介

蛋白表达技术广泛应用于蛋白结构解析、蛋白互作研究和蛋白功能研究等实验课题上，是分子生物学实验中常用的技术之一。传统的蛋白表达大多采用细胞体系，如大肠杆菌表达体系、酵母表达体系、昆虫表达体系等，但不同细胞体系表达存在不同问题，如表达时间长、蛋白产量低、折叠不正确、形成不溶的包涵体等问题，而且对于膜蛋白和毒性蛋白不能正常表达。

Cell-Free System (CFS) 无细胞蛋白表达技术，利用含有蛋白合成所需的所有组分（tRNA、氨基酸、酶、辅助因子、离子环境等）的麦胚提取物，以 PCR 片段或载体为模板进行体外蛋白表达。CFS 不受细胞内的组分（宿主 DNA/RNA、蛋白酶等）、细胞承受能力和生长代谢情况的影响，可以在短时间内完成大量蛋白的表达，同时能够使蛋白保持的天然结构和活性。

该系统应用至今，已成功表达多种蛋白。人类基因与蛋白数据库（Human Gene and Protein Database, HGPD）以 CFS 为蛋白合成方法，已成功合成 19712 种人类蛋白（Nucleic Acids Research, 2012 Jan; 40(D1): D924-9）。此外，对于其他不同物种来源的蛋白都能成功表达。

拟南芥	蛋白激酶	500	小鼠	蛋白激酶	300
	蛋白磷酸化酶	86		转录因子	900
	转录因子	750		蛋白酶	180
	蛋白酶	50		膜蛋白	180
人类	蛋白激酶	300		自身抗原	240
	蛋白磷酸化酶	80	疟原虫		1000
	转录因子	900	病毒		70
	核受体	38	原核生物		300
	蛋白酶	75			
(Nature Methods 2008,5,1011-1017)					

无细胞蛋白表达系统与传统的细胞内表达系统相比，无需筛选、培养和诱导，大大简化了操作步骤，能够在短时间内完成从模板到目的蛋白的全部实验。此外，体外表达没有生理限制，显著地提高了具有功能性、可溶性、全长蛋白的总体产量，并且能够实现磷酸化修饰，不受蛋白毒性影响。该系统十分适合激酶、膜蛋白和蛋白的表达，对于大分子蛋白和毒蛋白等常规细胞内表达系统无法表达的蛋白具有良好的表达效果。CFS 是真正的“开放”系统，具有超高的自由度，可以在体系中加入去污剂、金属离子等添加剂以促进蛋白复合体的组装，提高蛋白的活性；可以通过修饰的 tRNA 在特定位点插入非天然氨基酸标记；更能同时在同一体系中表达多个蛋白，模拟蛋白互作的情况。CFS 表达的蛋白可广泛用于蛋白质结构和功能分析等各类下游实验。

无细胞蛋白表达系统特点

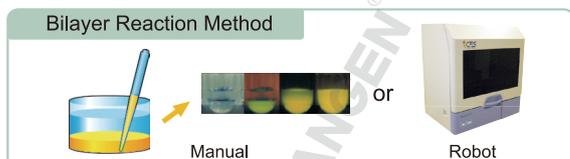
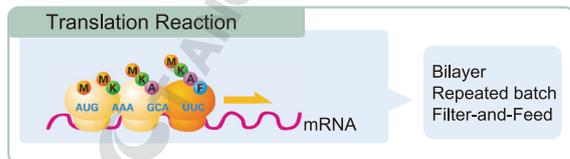
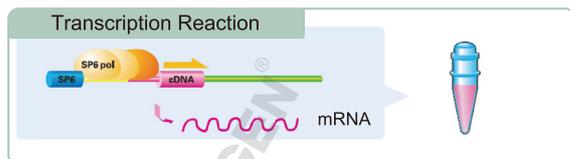
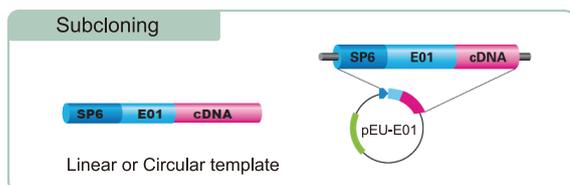
- 表达快速：只需 2-24 小时即可完成实验。
- 操作简便：只需加入模板、提取物和底物即可开始表达，像做 PCR 一样简单。
- 普适性强：突破传统细胞内表达的极限，实现大分子蛋白、毒蛋白、膜蛋白及不溶蛋白的表达。
- 表达量高：表达量可达 1 mg/6 ml 反应体系，满足各类实验需要。
- 自由度高：可根据需求添加蛋白酶抑制剂、稀有密码子、金属离子等添加剂，或进行 tRNA 修饰和氨基酸标记等。
- 状态天然：绝大多数表达出的蛋白具有天然的结构和活性。
- 蛋白共表达：可以进行多个模板的同时表达，表达出的多个蛋白自动组装。

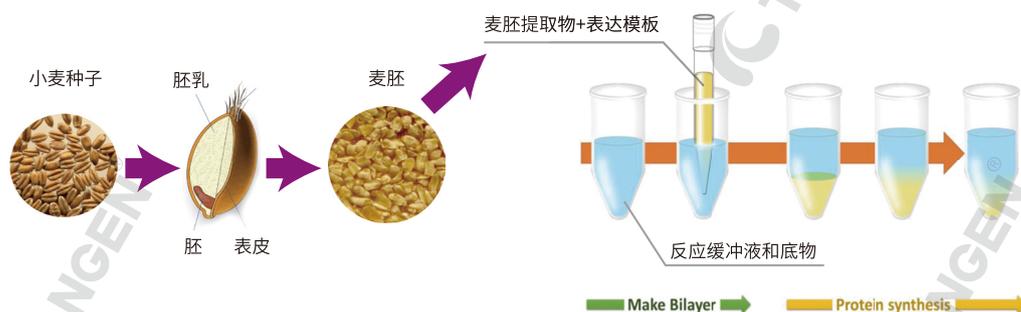
无细胞蛋白表达系统与传统细胞表达系统特点比较

	大肠杆菌表达体系	CFS 无细胞表达体系
表达模板	质粒	PCR 片段或质粒
蛋白大小	大于 100 kda 的蛋白很难表达	可表达高至 360 kda 的蛋白
表达时间	从拿到正确模板开始, 约 3-5 天	从拿到正确模板开始, 约 4 小时 -1 天
细菌培养	需要	不需要
诱导表达	需要	不需要
表达成功率	一般, 需要多次调试	95% 以上蛋白成功表达
表达量	不同蛋白表达量差异大, 约 30% 的蛋白表达量较高	90% 以上蛋白表达量较高
包涵体	有, 需要多次调试后避免	几乎没有
蛋白折叠	需特殊处理才能正确折叠, 如翻译后去折叠, 然后再折叠	随着翻译过程, 正确折叠成自然状态
内源蛋白降解	有	无
密码子优化	难	容易
膜蛋白表达	无法表达	加入脂质体, 正常表达和组装
毒蛋白表达	无法表达	无细胞, 毒性无用, 正常表达
多蛋白同时表达	无法表达	多个蛋白可以同时在一个体系中表达, 并且可以自动组装成与 in vivo 结构相同的复合体
内毒素	有	无

无细胞蛋白表达的流程

CFS 系列用于蛋白表达, 需要模板构建、转录和翻译三个步骤。首先构建携带 SP6 启动子、E01 增强子、目的基因的线性模板或质粒, 随后在转录反应液中进行体外转录, 再以获得的 mRNA 为模板进行翻译反应。翻译一般采用双层液相法 (Bilayer Reaction Method), 方便快捷。





双层液相反应法（Bilayer Reaction Method）通过反应液和麦胚提取物造成的密度差，相互渗透，在液面相交处发生反应。随着时间的推移，溶液逐渐由两相变为单一的混合物而终止。

无细胞蛋白表达系列产品选购指南

产品	目录号	产品规格	转录翻译形式	反应时间	蛋白得率*	产品说明
Premium One Expression Kit	CFS-EDX-ONE	55 μ l \times 24 rxn	一管式偶联进行	4-12小时	1-3 μ g	可用于检测基因克隆、载体构建和蛋白表达是否成功。
Protein Research Kit	CFS-PRK-S16	226 μ l \times 16 rxn	非偶联	1小时转录，20小时翻译	30 μ g	中量表达试剂盒，在Premium One检测正常表达后可直接使用
Protein Research Kit (G)	CFS-PRK-G16	226 μ l \times 16 rxn	非偶联	1小时转录，20小时翻译	30 μ g	更适用于GST标签蛋白表达的Protein Research Kit.
Protein Research Kit (H)	CFS-PRK-H16	226 μ l \times 16 rxn	非偶联	1小时转录，20小时翻译	30 μ g	更适用于His标签蛋白表达的Protein Research Kit.
WEPRO7240 Core Kit	CFS-C7	226 μ l \times 96 rxn 1.2 ml \times 20 rxn 6 ml \times 4 rxn	非偶联	6小时转录，20小时翻译	20 μ g-1 mg	大量表达试剂盒，在Premium One检测正常表达后可直接使用
WEPRO7240 Core Kit (G)	CFS-C7G	226 μ l \times 96 rxn 1.2 ml \times 20 rxn 6 ml \times 4 rxn	非偶联	6小时转录，20小时翻译	20 μ g-1 mg	更适用于GST标签蛋白表达的WEPRO 7240 Core Kit.
WEPRO7240 Core Kit(H)	CFS-C7H	226 μ l \times 96 rxn 1.2 ml \times 20 rxn 6 ml \times 4 rxn	非偶联	6小时转录，20小时翻译	20 μ g-1 mg	更适用于His标签蛋白表达的WEPRO 7240 Core Kit.
ProteoLiposome PLUS Expression Kit	CFS-EDX-PLUS-PLE	240 μ l \times 8 rxn	非偶联	1小时转录，20小时翻译	10 μ g	带有脂质体，可用于检测基因克隆、载体构建和蛋白表达是否成功。
ProteoLiposome BD Expression Kit	CFS-PLE-BD	2.5 ml \times 6 rxn	非偶联	1小时转录，20小时翻译	500 μ g	专门的膜蛋白表达试剂盒，带有脂质体。
Disulfide Bond PLUS Expression Kit	CFS-EDX-DB	230 μ l \times 8 rxn	非偶联	1小时转录，20小时翻译	30 μ g	具有二硫键修饰功能的试剂盒，不含DTT，利于IgG抗体-Fab片段和含二硫键蛋白的表达

注：如需订购 pEU 系列质粒，请联系 TIANGEN 客服。

*：为该反应体系总蛋白，以 GFP/DHFR/T1R1 为例进行蛋白表达，使用 BCA 蛋白定量试剂盒定量。

注意事项

- 试剂不宜长期存放于干冰中，请尽快移入 -80°C 冰箱内。
- 试剂反复冻融不要超过 2 次。第一次使用时请及时分装。
- 推荐使用 RNase-Free ddH₂O 溶解质粒，避免 RNase 污染。

Premium One 无细胞蛋白表达试剂盒

Premium One Expression Kit

—少量蛋白表达试剂盒，快速鉴定载体表达是否成功

目录号	包装	价格
CFS-EDX-ONE	55 μ l \times 24 rxn	5000 元

产品包装

试剂盒组成	含量
WEPRO TTMix	70 μ l
SUB-AMIX TT	1.3 ml
SPU Primer	100 μ l
deSP6E01 Primer	100 μ l
pEU-E01-DYKDDDDK-DHFR	10 μ l
FluoroTect™ Green _{Lys} tRNA	4 μ l

自备试剂

使用 PCR 片段模板需自备特异性引物（详见说明书）

保存条件

低于 -90~-65°C 保存，避免长期存放于干冰环境，反复冻融不超过 2 次。

下游应用

可用于考马斯亮蓝染色、Western Blot 检测等下游蛋白检测。还可作为模板测试试剂，检测模板是否正常表达，从而将此模板成功用于其他试剂盒中。

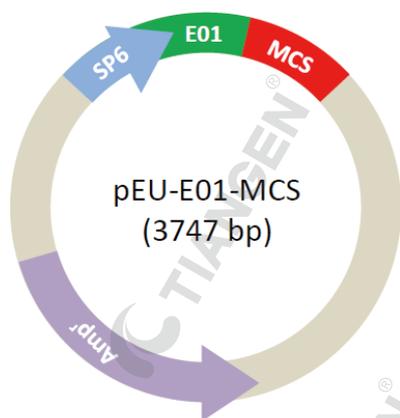
产品简介

本试剂盒能够通过线性模板或质粒模板实现小规模蛋白表达。本试剂盒采用转录和翻译偶联的方法，试剂盒中提供麦胚无细胞蛋白表达系统预混 mix，mix 中包含蛋白转录、翻译的所有必需酶类、tRNA 和离子环境，只需加入 DNA 模板即可一步完成蛋白的转录和翻译，直接获取目的蛋白。此外，试剂盒中还包括线性模板构建所需 PCR 引物，以及 pEU-E01-DHFR 质粒作为阳性对照，另提供带有荧光标记的赖氨酸-tRNA，用以标记合成蛋白，便于观测。本试剂盒利用双层液相反应法（Bilayer）表达目的蛋白，只需 1-4 小时即可观察到目的蛋白，除了可以应用于 Western 蛋白检测实验之外，还可作为模板测试试剂，快速检测目的质粒或片段能否成功表达目的蛋白。能够在本试剂盒表达成功的模板质粒或片段，可直接应用于 CFS 系列其他试剂盒中，做大量蛋白表达使用。

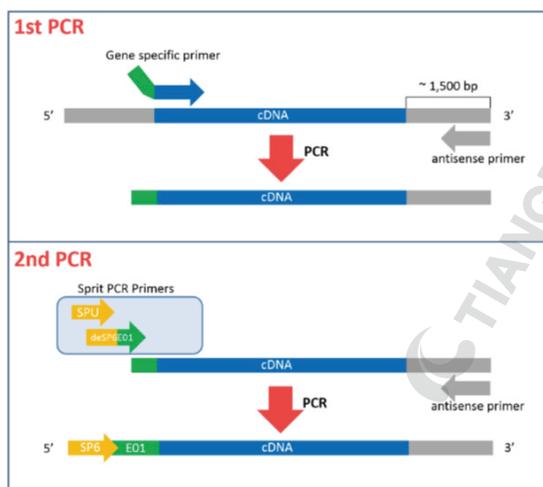
产品特点

- 选择方便：可用质粒模板，也可直接使用 PCR 片段进行蛋白表达。
- 操作简单：采用 Bilayer 反应方法，不需要特殊仪器，只需加入模板即可进行反应。
- 表达快速：1-4 小时即可观察到目的蛋白表达。
- 检测容易：可选择使用荧光标记的 Lys-tRNA，用过荧光直接检测蛋白表达效果。

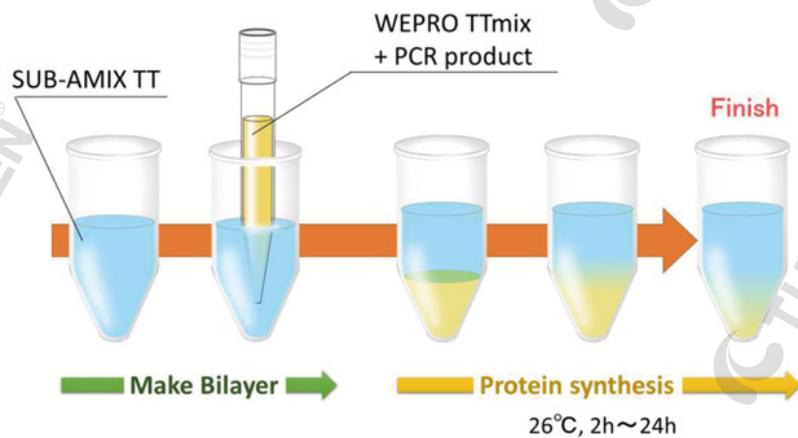
实验例



使用质粒作为表达模板时，可以使用 pEU 系列质粒作为表达载体，将带有起始密码子和终止密码子的 cDNA 克隆至载体上，提取质粒后直接用于蛋白表达。亦可使用其他带有 SP6 启动子的表达载体进行蛋白表达，不要使用 T7 启动子。



使用 PCR 片段做表达模板时，应使用两步 PCR 反应，将核糖体结合位点和转录启动子作为上游引物的 5' 端，经 PCR 反应结合到片段上。片段纯化后可用于蛋白表达。



转录和翻译采用双层液相反应法（Bilayer Reaction Method），通过反应液和麦胚裂解物造成的密度差，相互渗透，在液面相交处发生反应。随着时间的推进，溶液逐渐由两相变为单一的混合物而终止。

Protein Research 无细胞蛋白表达试剂盒

Protein Research Kit

—快速中量蛋白表达试剂盒

目录号	包装	价格
CFS-PRK-S16	226 μ l \times 16 rxn	13000 元
CFS-PRK-H16	226 μ l \times 16 rxn	14000 元
CFS-PRK-G16	226 μ l \times 16 rxn	14000 元

产品包装

试剂盒组成	含量
Transcription Premix LM	16 \times 18 μ l
WEPRO [®] 9240/WEPRO [®] 9240H	
/WEPRO [®] 9240G	16 \times 10 μ l
SUB-AMIX [®] SGC	16 \times 206 μ l
Aluminum seal	4

自备试剂

使用 PCR 片段模板需自备特异性引物（详见说明书）

保存条件

低于 -90~-65 $^{\circ}$ C 保存，避免长期存放于干冰环境，反复冻融不超过 2 次。

下游应用

可用于考马斯亮蓝染色、Western Blot 检测等下游蛋白检测实验。蛋白经纯化后，可用于 EMSA、IP 等常规蛋白结构和功能验证等实验。

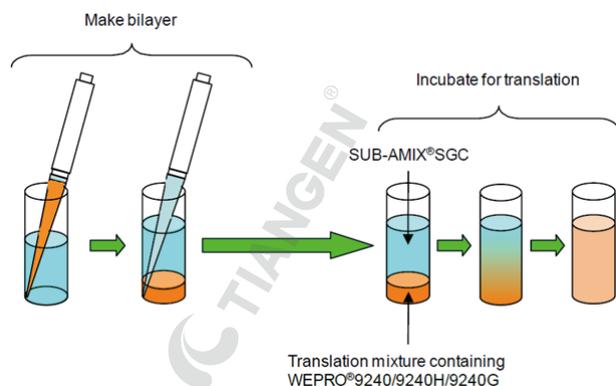
产品简介

本系列试剂盒能够通过线性模板或质粒模板实现蛋白的中量表达。本系列试剂盒采用转录和翻译非偶联的方法，试剂盒中提供包含体外转录所需的酶、NTP 和离子环境的 Transcription PreMix LM，加入模板后先完成 DNA 的转录，再配合麦胚无细胞蛋白表达系统预混 mix 完成 mRNA 的翻译，该 mix 中包含蛋白翻译的所有必需酶类、各种 tRNA 和离子，从而获取目的蛋白。本系列试剂盒利用双层液相反应法（Bilayer）表达目的蛋白，每个反应蛋白表达量为 30 μ g 左右，适合 Western Blot、CBB 染色等蛋白检测实验和蛋白结构解析以及免疫共沉淀等常见蛋白质功能解析。此外，本系列中的 H16 和 G16 试剂盒专门为表达 His 标签蛋白和 GST 标签蛋白做特殊优化，使得纯化后的蛋白纯度更高。

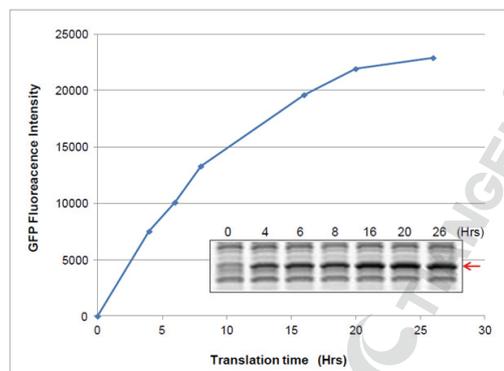
产品特点

- 选择方便：可用质粒模板，也可直接使用 PCR 片段进行蛋白表达。
- 操作简单：采用 Bilayer 反应方法，不需要特殊仪器，只需加入模板即可进行反应。
- 表达高效：一天内完成蛋白表达，蛋白表达量可达 30 μ g。
- 适用面广：特别针对 His 标签蛋白或 GST 标签蛋白的表达进行特殊优化，提高纯度。

实验例



蛋白翻译采用双层液相反应法（Bilayer Reaction Method），通过反应液和麦胚裂解物造成的密度差，相互渗透，在液面相交处发生反应。随着时间的推移，溶液逐渐由两相变为单一的混合物而终止。



使用 Protein Research Kit 表达 GFP 蛋白，分别用荧光检测（折线图）和考马斯亮蓝（CBB）染色检测（PAGE 图）蛋白表达量。转录时间为 37 $^{\circ}$ C 1 小时，翻译温度为 15 $^{\circ}$ C，通过翻译时间梯度展示蛋白表达量。结果显示，翻译 4 小时即可观测到蛋白表达，20 小时可达到最大蛋白表达量。

WEPRO 7240 无细胞蛋白表达试剂盒

WEPRO 7240 Core Kit

——快速大量蛋白表达试剂盒

目录号	包装	价格
CFS-C7	226 μ l \times 96 rxn 1.2 ml \times 20 rxn 6 ml \times 4 rxn	26000 元
CFS-C7H	226 μ l \times 96 rxn 1.2 ml \times 20 rxn 6 ml \times 4 rxn	28000 元
CFS-C7G	226 μ l \times 96 rxn 1.2 ml \times 20 rxn 6 ml \times 4 rxn	28000 元

产品包装

试剂盒组成	含量
WEPRO [®] 7240/WEPRO [®] 7240G/ WEPRO [®] 7240H Extract	1000 μ l
5 \times Transcription Buffer LM	240 μ l
NTP Mix (25 mM)	120 μ l
RNase Inhibitor (80 U/ μ l)	15 μ l
SP6 RNA Polymerase (80 U/ μ l)	15 μ l
Creatine Kinase (20 mg/ml)	20 μ l
40 \times SUB-AMIX [®] SGC S-1	600 μ l
40 \times SUB-AMIX [®] SGC S-2	600 μ l
40 \times SUB-AMIX [®] SGC S-3	600 μ l
40 \times SUB-AMIX [®] SGC S-4	600 μ l

保存条件

低于 -90~-65 $^{\circ}$ C 保存，避免长期存放于干冰环境，反复冻融不超过 2 次。

下游应用

可用于考马斯亮蓝染色、Western Blot 检测等下游蛋白检测实验。蛋白经纯化后，可用于 EMSA、IP 等常规蛋白结构和功能验证等实验，也可同时表达多个蛋白，模拟蛋白互作或复合体组装的研究。

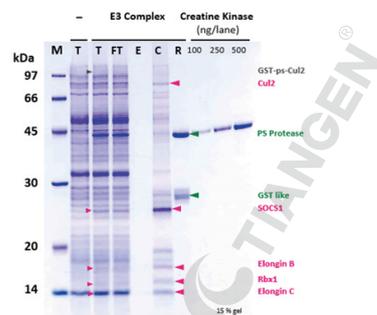
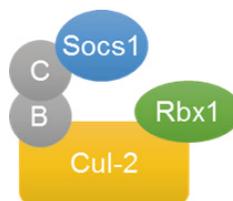
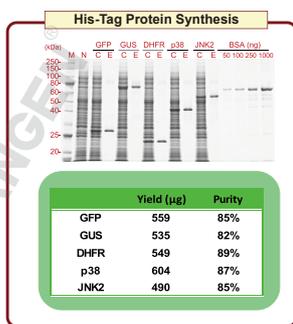
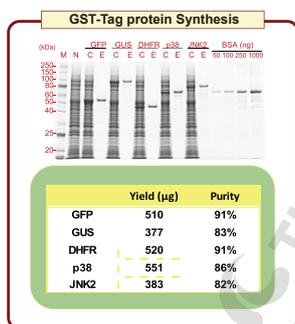
产品简介

本系列试剂盒能够通过质粒模板实现蛋白的大量表达。本系列试剂盒采用转录和翻译非偶联的方法，试剂盒中提供 SP6 RNA 聚合酶，NTP，RNase Inhibitor 以及 Transcription Buffer LM，加入模板后先完成 DNA 的转录，再配合麦胚无细胞蛋白表达系统预混 mix 完成 mRNA 的翻译，该 mix 中包含蛋白翻译的所有必需酶类、各种 tRNA 和离子，从而获取目的蛋白。本系列试剂盒可选择小、中、大三种表达规模，利用双层液相反应法 (Bilayer) 表达目的蛋白，使用小规模蛋白表达最高可达 30 μ g 左右，大规模表达最高可达 1 mg，非常适合 Western Blot、CBB 染色等蛋白检测实验和蛋白结构解析以及免疫共沉淀、酶功能检测、抗体检测等常见蛋白质功能解析。特别地，本系列试剂盒还支持多个质粒模板在一个体系中同时表达，并且可以在表达之后正确模拟体内的蛋白复合体自组装。此外，本系列中的 C7H 和 C7G 试剂盒专门为表达 His 标签蛋白和 GST 标签蛋白做特殊优化，使得纯化后的蛋白纯度更高。

产品特点

- 操作简单：采用 Bilayer 反应方法，不需要特殊仪器，只需加入模板即可进行反应。
- 体系灵活：可以根据后续应用自由选择小、中、大三种不同的表达规模。
- 功能模拟：可以同时表达多个蛋白，并且表达之后的蛋白可以正确模拟体内相互结合的情况。
- 表达高效：一天内完成蛋白表达，蛋白表达量可达 1 mg。
- 适用面广：特别针对 His 标签蛋白或 GST 标签蛋白的表达进行特殊优化，提高纯度。

实验例



使用 WEPRO 7240G/H 试剂盒分别小规模表达多个 GST 标签蛋白和 His 标签蛋白，用考马斯亮蓝 (CBB) 染色检测 (PAGE 图) 蛋白表达量，并用对应方法纯化后，检测蛋白得率和纯度。结果显示，WEPRO 7240G/H 表达蛋白成功率高，纯化后蛋白得率可达 300-600 μ g，纯度高，适合下游各类蛋白结构和功能研究。

HIV 的病毒感染因子由 Rbx1, ElonginB, ElonginC, SOCS1, Cullin2 五个蛋白构成。将前四个蛋白的质粒和 GST-tagged Cullin2 质粒用 WEPRO 7240 在一个体系内同时表达，GSH 纯化后使用 CBB 染色检测。结果显示，5 个蛋白均成功表达，并且经 GSH 纯化后，5 个蛋白均可成功标记，证明 5 个蛋白在分别表达成功后，在体系内结合形成了复合体。WEPRO 7240 不但可以成功同时表达多个蛋白，并且可以保持蛋白的结构和功能，在 in vitro 体系中正确模拟 in vivo 蛋白复合体的组装。

ProteoLiposome PLUS 无细胞膜蛋白表达试剂盒

ProteoLiposome PLUS Expression Kit

— 简便快速表达中量膜蛋白

目录号	包装	价格
CFS-EDX-PLUS-PLE	240 μ l \times 8 rxn	9500 元

产品包装

试剂盒组成	含量
pEU-E01-T1R1 (1.0 μ g/ μ l)	5 μ l
pEU-E01-MCS (1.0 μ g/ μ l)	5 μ l
Transcription Premix LM	8 \times 18 μ l
WEPRO [®] 9L	8 \times 21 μ l
SUB-AMIX [®] SGC	8 \times 210 μ l
Aluminum seals	2

自备试剂

无

保存条件

低于 -90~-65 $^{\circ}$ C 保存，避免长期存放于干冰环境，反复冻融不超过 2 次。

下游应用

可用于考马斯亮蓝染色、Western Blot 检测等下游蛋白检测实验和下游膜蛋白功能解析，还可作为模板测试试剂，检测模板是否正常表达，从而将此模板成功用于其他试剂盒中。

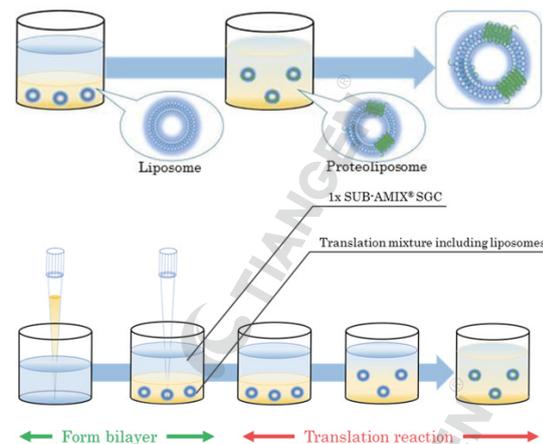
产品简介

本系列试剂盒特别针对膜蛋白表达设计，能够通过质粒模板实现膜蛋白的少量表达。本系列试剂盒采用转录和翻译非偶联的方法，试剂盒中提供包含体外转录所需的酶、NTP 和离子环境的 Transcription PreMix LM，加入模板后先完成 DNA 的转录，再配合麦胚无细胞蛋白表达系统预混 mix 完成 mRNA 的翻译，该 mix 中包含蛋白翻译的所有必需酶类、各种 tRNA 和离子，另外含有特殊的脂质体，使目的蛋白能够在脂质体的生物膜上正确合成和组装。本系列试剂盒利用双层液相反应法 (Bilayer) 表达目的蛋白，每个反应蛋白表达量为 10 μ g 左右，适合 Western Blot、CBB 染色等蛋白检测实验和下游膜蛋白功能解析。此外，本试剂盒还可作为模板测试试剂，检测目的质粒能否成功表达目的蛋白。能够在本试剂盒表达成功的模板质粒，可直接应用于 ProteoLiposome BD Expression Kit (CFS-PLE-BD) 中，做大量膜蛋白表达使用。

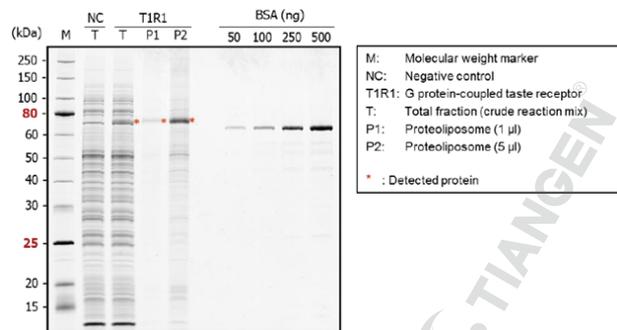
产品特点

- 针对性强：含有脂质体，特别针对传统方法难表达、难组装的膜蛋白设计。
- 操作简单：采用 Bilayer 反应方法，不需要特殊仪器，只需加入模板即可进行反应。
- 表达高效：一天内完成蛋白表达，蛋白表达量约为 10 μ g。

实验例



蛋白翻译采用双层液相反应法 (Bilayer Reaction Method)，通过反应液和麦胚裂解物造成的密度差，相互渗透，在液面相交处发生反应。随着时间的推移，溶液逐渐由两相变为单一的混合物而终止。在下层液中加入脂质体 (liposomes)，蛋白可直接在脂质体上合成和组装。



使用 ProteoLiposome PLUS Expression Kit 表达膜蛋白——G 蛋白偶联受体 T1R1，使用考马斯亮蓝 (CBB) 染色检测 (PAGE 图) 蛋白表达量。转录时间为 37 $^{\circ}$ C 1 小时，翻译时间为 15 $^{\circ}$ C 4 小时。结果显示，翻译 4 小时即可观测到膜蛋白表达。延长翻译时间蛋白得率更高，翻译 20 小时可达到最大蛋白表达量。

ProteoLiposome BD 无细胞膜蛋白表达试剂盒

ProteoLiposome BD Expression Kit

—简便快速表达大量膜蛋白

目录号	包装	价格
CFS-PLE-BD	2.5 ml × 6 rxn	50000 元

产品包装

试剂盒组成	含量
WEPRO®7240	1 ml
5× Transcription Buffer LM	0.4 ml
NTP Mix (25 mM)	0.2 ml
SP6 RNA Polymerase (80 U/μl)	30 μl
RNase Inhibitor (80 U/μl)	30 μl
Creatine Kinase (20 mg/ml)	20 μl
pEU-E01-T1R1 plasmid (1 mg/ml)	30 μl
40×SUB-AMIX® SGC S-1	12.5 ml
40×SUB-AMIX® SGC S-2	12.5 ml
40×SUB-AMIX® SGC S-3	12.5 ml
40×SUB-AMIX® SGC S-4	12.5 ml
Asolectin Liposome, lyophilized	Lyophilized

自备试剂

如使用透析法表达, 需要透析管 (详见说明书)

保存条件

低于 -90~-65℃保存, 避免长期存放于干冰环境, 反复冻融不超过 2 次。

产品简介

本系列试剂盒特别针对膜蛋白表达设计, 能够通过质粒模板实现膜蛋白的大量表达。本系列试剂盒采用转录和翻译非偶联的方法, 试剂盒中提供 SP6 RNA 聚合酶, NTP, RNase Inhibitor 以及 Transcription Buffer LM, 加入模板后先完成 DNA 的转录, 再配合麦胚无细胞蛋白表达系统预混 mix 完成 mRNA 的翻译, 该 mix 中包含蛋白翻译的所有必需酶类、各种 tRNA 和离子, 加入脂质体之后, 目的蛋白能够在脂质体的生物膜上正确合成和组装。本系列试剂盒利用双层液相反应法 (Bilayer) 表达目的蛋白, 每个反应蛋白表达量为 500 μg 左右, 适合 Western Blot、CBB 染色等蛋白检测实验和下游膜蛋白功能解析。

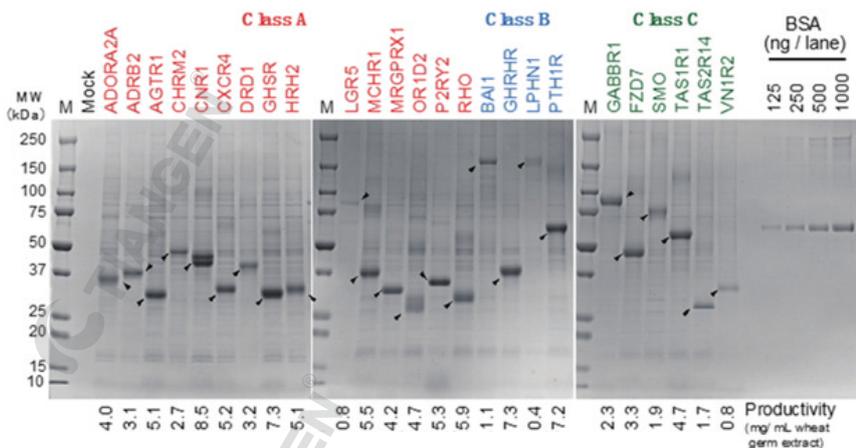
产品特点

- 针对性强: 含有脂质体, 特别针对传统方法难表达、难组装的膜蛋白设计。
- 操作简单: 采用 Bilayer 反应方法, 不需要特殊仪器, 只需加入模板即可进行反应。
- 表达高效: 一天内完成蛋白表达, 蛋白表达量可达 500 μg。

下游应用

可用于考马斯亮蓝染色、Western Blot 检测等下游蛋白检测实验, 纯化后的膜蛋白可广泛用于跨膜结构研究、信号通路研究等各类膜蛋白结构和功能解析。

实验例



使用 ProteoLiposome BD Expression Kit 表达 25 个膜蛋白, 使用考马斯亮蓝 (CBB) 染色检测 (PAGE 图) 蛋白表达效果。结果显示, 25 个膜蛋白都能成功表达, 而且表达量均在 mg 级别, 最大可达 8.5 mg。

Disulfide Bond PLUS 无细胞蛋白表达试剂盒 NEW

Disulfide Bond PLUS Expression Kit

——二硫键增强型无细胞蛋白表达产品

目录号	包装	价格
CFS-EDX-DB	230 μ l \times 8 rxn	10000 元

产品包装

试剂盒组成	含量
Transcription Premix LM*	18 μ l
WEPRO® for DB PLUS*	16 μ l
SUB-AMIX® SGC DTT-free*	200 μ l
PDI & Ero1 α mix	40 μ l
SPU Primer	100 μ l
deSP6E01 Primer	100 μ l
pEU-E01-MCS	5.0 μ l
pEU-E01-His-tPA (297-562)	5.0 μ l

自备试剂

使用 PCR 片段模板需自备特异性引物（详见说明书）

保存条件

-90 ~ -65°C 保存，避免长期存放于干冰环境，反复冻融不超过 2 次。

下游应用

可用于考马斯亮蓝染色、Western Blot 检测等下游蛋白检测实验。蛋白经纯化后，可用于 EMSA、IP 等常规蛋白结构和功能验证等实验。

产品简介

本试剂盒能够通过线性模板或质粒模板表达具有二硫键的蛋白质。无细胞蛋白质表达系统中的蛋白质合成通常在还原性条件下进行，而二硫键是在内质网（ER）的氧化环境中形成。为解决这一问题，CFS-EDX-DB 试剂盒引入了参与真核生物二硫键形成的蛋白二硫键异构酶（PDI）和 ER 氧化还原酶 1 α （Ero1 α ）。为蛋白提供 DTT-free 的表达环境，以更好地稳定修饰蛋白中的二硫键。本系列试剂盒采用转录和翻译非偶联的方法，试剂盒中提供包含体外转录所需的酶、NTP 和离子环境的 Transcription PreMix LM，加入模板后先完成 DNA 的转录，再配合麦胚无细胞蛋白表达系统预混 mix 完成 mRNA 的翻译，该 mix 中包含蛋白翻译的所有必需酶类、各种 tRNA 和离子，从而获取目的蛋白。本系列试剂盒利用双层液相反应法（Bilayer）表达目的蛋白，适合 Western Blot、CBB 染色等蛋白检测实验和蛋白结构解析以及免疫共沉淀等常见蛋白质功能解析。

产品特点

- 针对性强：本品提供 DTT-free 的反应条件，利于 IgG 抗体 -Fab 片段和含二硫键蛋白的表达。
- 活性提高：在翻译反应中加入人内质网氧化还原酶（Ero1 α ）和蛋白质二硫异构酶（PDI），利于二硫键的形成。
- 操作简单：采用 Bilayer 反应方法，不需要特殊仪器，只需加入模板即可进行反应。
- 表达快速：一天内完成蛋白表达。

实验例

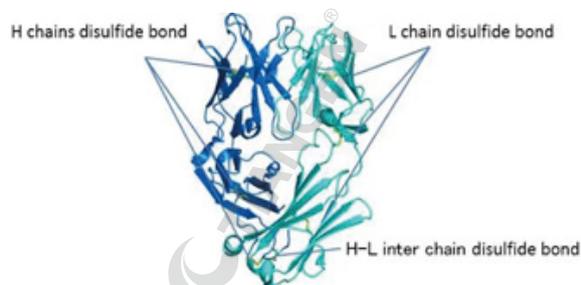


图 1：选择抗 AGIA-IgG 抗体（兔）的 Fab 片段作为测试蛋白，如图所示，该蛋白除了三个重链（H）和三个轻链（L）中的二硫键之外，Fab 片段还包含重链和轻链（H-L）之间的二硫键。此外，几个脯氨酸残基以顺式形式形成肽键。使用 CFS-EDX-DB 试剂盒表达了这个具有复杂结构的 Fab 片段，并通过 Pull-down 实验分析了它与 AGIA 抗原序列（EAAAGIARP）的结合能力。

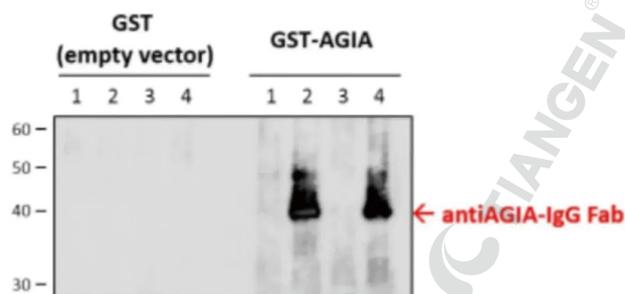


图 2：在四种不同的条件下（1: Empty, 2: + PDI and Ero1 α , 3: + CypB, 4: + PDI, Ero1, and CypB）合成蛋白，通过 Pull-down 实验验证 AGIA 序列与每个 Fab 片段的结合亲和力。Western blotting 结果验证，由 PDI 和 Ero1 α 合成的 Fab 片段（GST-AGIA 第 2 和第 4 道）确实与 AGIA 序列结合。

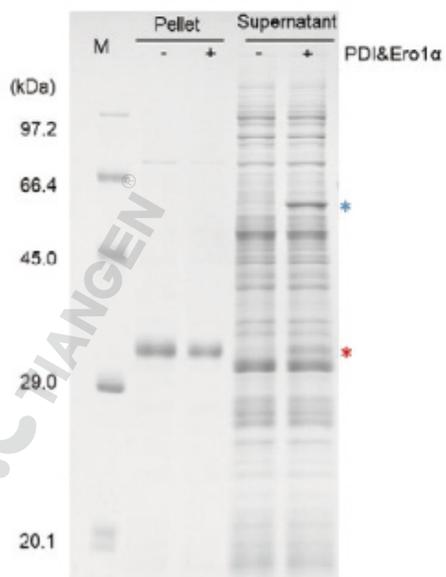


图3：使用 CFS-EDX-DB 表达对照质粒中 tPA 蛋白。His 标记的 tPA 蛋白片段的合成通过 SDS-PAGE 确认，使用 2 μ l 的样品，CBB 染色确认其活性。合成的蛋白质用 * 表示；添加的 PDI/Ero1 α 用 * 表示。

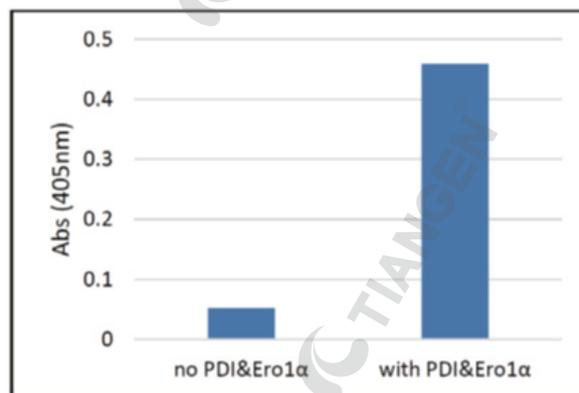


图4：对 tPA 蛋白酶进行活性检测，该活性取决于蛋白表达过程中 PDI 和 Ero1 α 的存在与否

pEU 质粒系列

pEU plasmids series

—CFS 系列试剂盒推荐的表达载体

产品包装

质粒	标签	标签位置	标签切除酶	规格 / 价格
pEU-E01-MCS	无	—	—	
pEU-E01-His-TEV-MCS	His	蛋白 N 端	TEV	
pEU-E01-MCS-TEV-His	His	蛋白 C 端	TEV	询价
pEU-E01-GST-PS-MCS	GST	蛋白 N 端	PreScission	
pEU-E01-MCS-PS-GST	GST	蛋白 C 端	PreScission	
pEU-E01-DYKDDDDK-MCS	FLAG	蛋白 N 端	无	

产品简介

pEU 系列质粒含有 SP6 启动子，是匹配 CFS 系列试剂盒的推荐质粒。pEU 系列质粒中包含多种不同质粒，方便各种不同用途的蛋白表达。

自备试剂

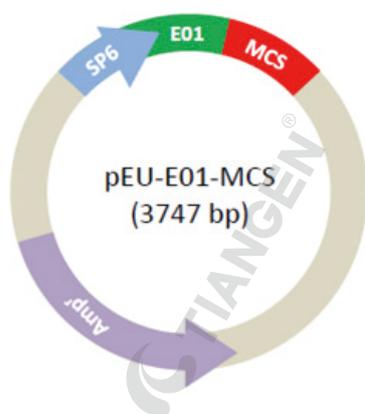
无

保存条件

-30~-15℃保存，避免反复冻融。

载体图谱

pEU-E01-MCS 载体图谱如下，载体序列可从 TIANGEN 官网说明书处下载。如需其他质粒图谱可联系在线客服。



↓*EcoRV* ↓*SpeI* ↓*XhoI* ↓*SacI* ↓*KpnI* ↓*NotI*
74- GATATCACTAGTCTCGAGCTCGGTACCTGTCGCGGTCGCGACGTACGCGGGCGGCC

↓*BamHI* ↓*SmaI* ↓*Sall* ↓*NcoI*
CCATAAATTGGATCATATATAGGGCCGGTTATAATTACCTCAGGTCGACGTCCCATGG -193

SP6 Promoter: -17~1
Translational Enhancer (E01):1~73
Multiple Cloning Site: 74~193
Origin: 1190~1830
Ampicillin Resistance Gene: 1974~2838

Position 1 is located at the final G (underlined in the following sequence) of SP6 Promoter:
ATTTTAGGTGACACTATAG

Q&A 无细胞蛋白表达系统常见问题分析

Q CFS 系列试剂盒使用的模板有什么要求?

A-1 对于 Premium One Kit 和 Protein Research Kit, 可以使用目的基因的 PCR 片段作为模板; 对于大量表达蛋白的 WEPRO7240 Kit 以及表达膜蛋白的试剂盒, 需使用质粒载体。

A-2 使用 PCR 片段作为模板时, 上游引物中应加入转录和翻译必须的元件 (SP6 启动子和 E01 增强子), 下游引物为基因特异性引物。引物设计方法请详见说明书。推荐采用两步 PCR 的方法加入所有元件。PCR 片段模板无需构建载体, 时间短, 获取容易, 表达效率约是质粒载体模板的 70%-80%。

A-3 使用质粒载体时, 推荐使用 pEU 系列载体。质粒纯度 A_{260}/A_{280} 的比值需在 1.7-1.9, 浓度为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 左右。高纯度的质粒 DNA 是 CFS 麦胚无细胞表达系统成功转录和翻译的关键, RNase 污染会导致转录后的 mRNA 被降解, 无翻译产物。推荐使用高纯度的质粒大提试剂盒提取, 以及无 RNase ddH₂O 溶解质粒。

Q 我已经构建了其他表达系统所使用的质粒模板, 是否可以在 CFS 系列试剂盒中通用?

A CFS 体系表达蛋白需要 SP6 启动子。带有 SP6 启动子的载体可在 CFS 系列试剂盒中正常表达, 其他启动子如 T7 等在 CFS 试剂中转录效率较低, 不推荐使用, 建议将 cDNA 重新克隆至 pEU 系列载体中。载体首次使用时, 推荐使用 Premium One Kit 进行测试。

Q CFS 系列试剂盒在操作时需要注意什么?

A-1 除使用高纯度的 PCR 片段或质粒模板外, 注意使用无核酸酶的试剂和耗材。

A-2 试剂盒需保存在 -80°C 冰箱中, 冻融不超过 2 次, 首次使用时请按需求分装。

A-3 双层液相构建时, 下层溶液请缓慢小心加入 (枪头接触离心管底部, 推入液体的过程请保持在 3 秒以上。双层溶液均为无色透明, 交界面折光率不同, 可仔细分辨)。双层液相建立后不要震动, 缓慢转移至金属浴 /PCR 仪上, 表达完毕后再混匀体系, 进行鉴定。

A-4 每次实验时, 需使用阳性对照。

Q 转录后得到的 mRNA 是否需要纯化?

A 在保证高质量的模板 DNA 的前提下, 绝大多数情况下无需纯化 mRNA。尤其是 pEU 载体的 5' 和 3' 序列改变了传统 mRNA 转录修饰, 可以生成不含 5' 端帽子结构和 3' poly(A) 尾的 mRNA。由于取消了 5' 帽子和 3' A 尾, CFS 表达系统不需复杂的 mRNA 浓度优化, 转录后的体系可直接用于蛋白翻译。

Q 阳性对照没有表达?

A-1 双层液相没有正确建立。下层溶液加入速度太快, 或者加入后吹打或者震动了离心管。请缓慢加入下层溶液, 加入后不要混匀, 保持离心管稳定静置。

A-2 表达时间和检验方法不匹配。对于 Western Blot 检测, 建议至少表达 2 小时; 对于荧光标记检测, 蛋白表达时间建议为 4 小时; 对于考马斯亮蓝染色, 蛋白表达时间建议为 12 小时, 时间过短可能导致表达量不满足考染的分辨率。

A-3 使用荧光标记检测的波长选择不正确。对于荧光标记的赖氨酸, 其激发光波长为 502 nm, 发射光波长为 510 nm。请选择合适的通道进行检测。

Q 阳性对照有表达, 但目的蛋白没有表达?

A-1 模板序列有问题, 如启动子不正常, 序列缺失或移码突变。请按说明书要求设计引物, 扩增及克隆时请选用高保真的 DNA 聚合酶, 模板序列需经过测序鉴定。

A-2 使用片段模板导致表达量略低, 或 PCR 引物未延长。使用 PCR 片段模板时, 请仔细阅读说明书, 下游

引物需在 mRNA 3' 末端下游 1500 bp 左右处设计，不可恰好设计在 mRNA 3' 末端处。此外，模板表达效率较低时，线性片段模板可能表达出的蛋白量较少，可换用质粒载体模板表达。

A-3 当目的载体表达效率低于阳性对照载体时，有可能导致同一时间内能检测到阳性对照蛋白，但检测不到目的蛋白。请适当延长蛋白表达时间，或参考上述“阳性对照没有表达”的 A-2 部分进行调试。

Q CFS 系统表达后，蛋白结构是否正常？

A 大多数情况下，蛋白正常模拟体内的自然结构，已经有多篇结构方面的文献发表（详见参考资料部分）。

Q CFS 系统表达的蛋白是否具有活性？

A 大多数情况下，蛋白表达后维持其自然活性。有数据表明，蛋白表达后鉴定有功能的概率是 77%（Goshima N et al., Nat Methods. 2008）。对于需要其他因子才能发挥功能的蛋白，合成时可以在双层液相配制时，在上层溶液内加入去污剂、金属离子、酶类、辅助蛋白等添加剂，辅助蛋白功能发挥及提高蛋白活性。

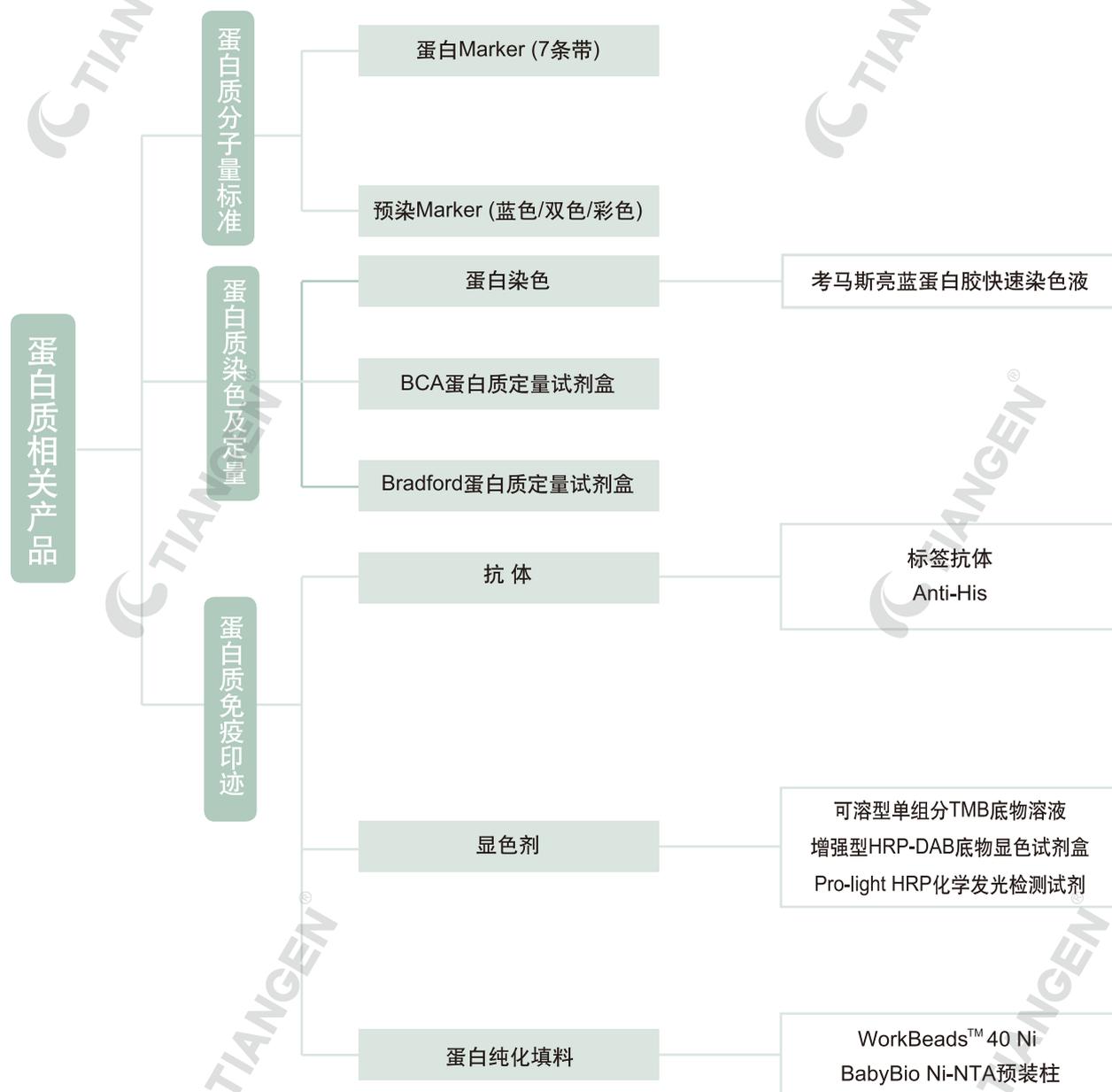
部分使用 TIANGEN 无细胞蛋白表达产品发表的文献列表

题目	期刊	IF	研究方向
Practical cell-free protein synthesis system using purified wheat embryos.	Nat Protoc	11.334	CFS 基本原理
Cell-free protein production and labeling protocol for NMR-based structural proteomics.	Nat Methods	28.467	蛋白折叠和结构解析
Structural Studies of Self-Assembled Subviral Particles: Combining Cell-Free Expression with 110 kHz MAS NMR Spectroscopy.	Angew Chem Int Ed Engl	12.257	蛋白折叠和结构解析
Wheat-germ cell-free production of prion proteins for solid-state NMR structural studies.	N Biotechnol	3.739	蛋白折叠和结构解析
A cell-free method for expressing and reconstituting membrane proteins enables functional characterization of the plant receptor-like protein kinase FERONIA.	J Biol Chem	4.106	膜蛋白合成
Production of monoclonal antibodies against GPCR using cell-free synthesized GPCR antigen and biotinylated liposome-based interaction assay.	Sci Rep	4.011	膜蛋白合成
Functional G-Protein-Coupled Receptor (GPCR) Synthesis: The Pharmacological Analysis of Human Histamine H1 Receptor (HRH1) Synthesized by a Wheat Germ Cell-Free Protein Synthesis System Combined with Asolectin Glycosomes.	Front Pharmacol	3.845	膜蛋白合成
Apoglobin Stability Is the Major Factor Governing both Cell-free and in Vivo Expression of Holomyoglobin.	J Biol Chem	4.106	蛋白功能研究
Rational optimization of amber suppressor tRNAs toward efficient incorporation of a non-natural amino acid into protein in a eukaryotic wheat germ extract.	Org Biomol Chem	3.49	蛋白功能研究
Wheat germ in vitro translation to produce one of the most toxic sodium channel specific toxins.	Biosci Rep	2.535	蛋白功能研究（毒性蛋白）

题目	期刊	IF	研究方向
Functional expression, purification, characterization, and membrane reconstitution of non-structural protein 2 from hepatitis C virus.	Protein Expr Purif	1.291	蛋白功能研究 (病毒蛋白)
Ubiquitin-proteasome system controls ciliogenesis at the initial step of axoneme extension.	Nat Commun	11.878	E3 泛素化连接酶研究
The ubiquitin ligase STUB1 regulates stability and activity of RUNX1 and RUNX1-RUNX1T1.	J Biol Chem	4.106	E3 泛素化连接酶研究
Wheat germ-based protein libraries for the functional characterisation of the Arabidopsis E2 ubiquitin conjugating enzymes and the RING-type E3 ubiquitin ligase enzymes.	BMC Plant Biol	3.67	E3 泛素化连接酶研究
A large-scale targeted proteomics assay resource based on an in vitro human proteome	Nat Methods	28.467	高通量蛋白合成
MEERCAT: Multiplexed Efficient Cell Free Expression of Recombinant QconCATs For Large Scale Absolute Proteome Quantification.	Mol Cell Proteomics	4.828	高通量蛋白合成
High-throughput synthesis of stable isotope-labeled transmembrane proteins for targeted transmembrane proteomics using a wheat germ cell-free protein synthesis system.	Mol Biosyst	2.855	高通量蛋白合成
Identification of new abscisic acid receptor agonists using a wheat cell-free based drug screening system.	Sci Rep	4.011	合成偶联生物素的蛋白, 用于抗原 - 抗体或受体 - 配体筛选
Profiling of autoantibodies in sera of pancreatic cancer patients.	Ann Surg Oncol	3.681	合成偶联生物素的蛋白, 用于抗原 - 抗体或受体 - 配体筛选

蛋白质相关产品选择指南

在生物体内，蛋白质扮演着构筑生命大厦的“砖块”角色，随着破译生命密码的人类基因组计划进入尾声，一个以蛋白质为研究重点的“后基因组时代”已经拉开序幕，蛋白质将是今后的重点研究方向之一。从2005年开始，TIANGEN公司陆续推出蛋白系列相关产品，包括抗体，蛋白质分子量标准，蛋白质显色试剂，蛋白胶快速染色液、蛋白质定量试剂盒等，力争为蛋白质学研究技术的不断进步和完善发挥力量。



关于 SDS-PAGE 凝胶电泳

SDS-PAGE 凝胶电泳是在 PAGE 凝胶电泳中引入阴离子去污剂 SDS，通过 SDS 打开分子内和分子间氢键，破坏蛋白质的二级和三级结构。蛋白质在一定浓度的含有 SDS 的溶液中，与 SDS 分子按比例混合，形成 SDS-蛋白质复合物，这种复合物由于结合了大量 SDS，使蛋白质丧失了原有的电荷状态形成仅保持原有分子大小为特征的负离子团块，从而降低或消除了各种蛋白质分子间天然的电荷差异。由于 SDS 与蛋白质的结合是与蛋白质分子量成比例的，因此在电泳时，蛋白质分子的迁移速度取决于蛋白质分子量大小。

SDS-PAGE 凝胶的有效分离范围

分离胶浓度 (%)	线性分离范围 (kDa)
15	12-43
10	16-68
7.5	36-94
5.0	57-212

SDS-PAGE 凝胶电泳常见问题分析

Q 蛋白带型聚团

- A-1** 上样过量
——降低蛋白上样量或降低蛋白浓度。
- A-2** 样品粘度过大
——延长煮沸时间。
- A-3** 样品沉淀
——加大样品中 SDS 的浓度。
- A-4** 样品中含有不溶物质
——离心或过滤样品以除去特定污染物。
- A-5** 制胶不佳
——确保制胶均匀，一次完成。

Q 哑铃形条带或“微笑”条带

- A-1** 上样体积过大导致不完全堆积
——使用恰当的上样体积，样品不宜过稀。
- A-2** 电压过大
——降低电压。
- A-3** 分离胶表面不平
——在制胶时使分离胶表面水平。
- A-4** 凝胶过期
——在指定的失效期前使用凝胶。

Q 蛋白 Marker 条带缺失或条带模糊

- A-1** 分离胶浓度不准确
——配制正确浓度的分离胶。
- A-2** 缓冲液放置过长
——定期更新缓冲液。
- A-3** 甲叉丙烯酰胺贮存液放置时间过长或配制不准确
——及时更新贮存液，此贮存液配制时在 37°C 水浴溶解 30 min 以上。
- A-4** 电泳时间过长
——观察前面的指示剂染料，掌握恰当的电泳时间。

蛋白质分子量标准

目录号	产品名称	包装	价格
MP102	蛋白质分子量标准 (14.4-94 kDa)	20 次	90 元

产品组成

产品名称	包装
蛋白质 Marker	200 μ l

浓度

0.1-0.2 μ g/ μ l

保存条件

-30~-15 $^{\circ}$ C 保存

产品简介

TIANGEN 公司研制生产的蛋白质 Marker 是由数种已知氨基酸序列蛋白质分别纯化后混合而成的蛋白质溶液，经 SDS-PAGE 凝胶电泳后用考马斯亮蓝染色可得清晰的蛋白带。建议使用分离胶浓度为 12%。

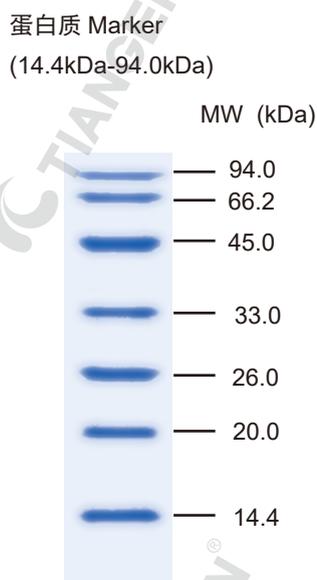
产品特点

- 适合于 12%-15%SDS-PAGE 电泳。
- 无需加热，直接上样，使用更方便。

适用范围

可用于 SDS-PAGE 电泳，用考马斯亮蓝染色。

电泳图



目录号：MP102

12%SDS-PAGE 凝胶电泳 (上样量 10 μ l)

预染蛋白质分子量标准

目录号	产品名称	包装	价格
MP204	预染蛋白质分子量标准 III (蓝色, 18-94 kDa)	20 次	180 元
MP206	宽范围彩色预染蛋白质分子量标准 (11-245 kDa)	20 次	350 元

产品组成

产品名称	包装
预染蛋白质 Marker III (蓝色)	200 μ l
宽范围彩色预染蛋白质 Marker	100 μ l

浓度

0.2-0.4 μ g/ μ l

保存条件

-30~-15 $^{\circ}$ C 保存

产品简介

预染蛋白质 Marker 为几种蛋白质分别纯化预染后混合而成的蛋白质溶液, 这些蛋白混合物与蓝色或彩色染料共价偶联, 可在凝胶电泳时出现强度均匀的蛋白带, 可以直接观察蛋白电泳及判断 Western 转移效果。同未预染的蛋白标准相比, 预染蛋白 Marker 因与染料共价偶联而在 SDS-PAGE 电泳时的迁移特性发生某些改变。如果要精确判定分子量, 推荐将 TIANGEN 公司的非预染蛋白质 Marker (目录号: MP102) 与预染蛋白 Marker 配合使用。

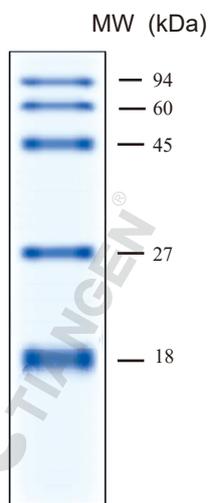
产品特点

- 电泳时、电泳后或转膜后均能通过肉眼观察蛋白条带。
- 无需加热, 直接上样, 使用更方便。

适用范围

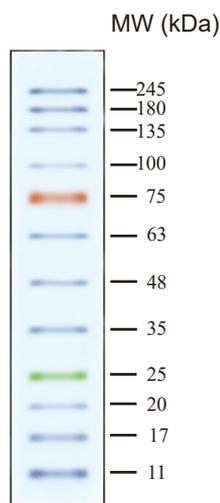
蛋白质凝胶电泳和蛋白质转移 (从胶上到膜上)。

预染蛋白质 Marker III (蓝色) (18 kDa-94 kDa)



目录号: MP204
12% SDS-PAGE 电泳
(上样量 10 μ l)

宽范围彩色预染蛋白质 Marker (11 kDa-245 kDa)



目录号: MP206
4%-20% SDS-PAGE 电泳
(上样量 5 μ l)

考马斯亮蓝快速染色液

CBB Fast Staining Solution

——快速染色、灵敏度高、安全无害

目录号	包装	价格
PA101	100 ml	50 元

适用范围

SDS-PAGE 或非变性 PAGE 蛋白电泳胶的快速染色，或 Western 转膜后 PAGE 胶上残余蛋白的检测。

自备试剂

双蒸水或去离子水

保存条件

2-8°C 保存

产品简介

TIANGEN 公司研制生产的考马斯亮蓝快速染色液是一种即用型快速灵敏而且安全的考马斯亮蓝 G-250 染液，采用独特配方配制而成，用于 SDS-PAGE 或非变性 PAGE 蛋白电泳胶的快速染色。这种染料节省了制备相关溶液所需的时间和精力，无毒性而且不需要酸、醇固定或者脱色，以其方便快捷的操作，卓越的灵敏度，成为蛋白质染色产品中的推荐之选。

产品特点（与常规考马斯亮蓝染色液相比较）

考马斯亮蓝快速染色液

- 染色快，脱色快，全过程仅需 10 min。
- 全新配方，不含甲醇、乙酸，无毒，无刺激性气味。
- 低背景，高灵敏度，BSA 灵敏度可低至 30 ng。
- 易操作，易保存，不需特殊设备，脱色后凝胶可在纯水中保存数月。

常规甲醇考马斯亮蓝染色液

- 染色、脱色长达 4 h 以上。
- 含甲醇、乙酸，强刺激性气味，影响身体健康。
- 灵敏度低，BSA 灵敏度达到 100 ng。
- 需要特殊配制的缓冲液来保存凝胶，长期保存需要制成干胶。

染色结果



常见问题及分析

Q 背景高

A-1 脱色不充分

——电泳结束后，取胶放入双蒸水或去离子水中，延长洗涤时间或增加洗涤次数。

Q 染色后未见蛋白条带

A-1 SDS 及盐类等杂质未除尽

——电泳结束后，取胶放入双蒸水或去离子水中，延长洗涤时间或增加洗涤次数。

A-2 染色时间过短

——延长煮沸时间或染色时间。

A-3 蛋白上样量太少

——建议在电泳时加两个不同量的 BSA，并将此两个泳道作为阳性对照。

BCA 蛋白质定量试剂盒

BCA Protein Assay Kit

——快速、便捷、灵敏、兼容性好

目录号	包装	价格
PA115-01	50 次 (试管检测) 500 次 (微板检测)	380 元
PA115-02	250 次 (试管检测) 2500 次 (微板检测)	1000 元

产品组成

试剂盒组成	PA115-01	PA115-02
BCA 试剂 A	100 ml	500 ml
BCA 试剂 B	3 ml	15 ml
BSA 标准品 (2 mg/ml)	2 × 1 ml	10 × 1 ml

保存条件

BCA 试剂 A 和 BCA 试剂 B: 室温 (15-30°C) 保存
BSA 标准品: -30~-15°C 保存

产品应用

测定含有较高浓度去垢剂蛋白溶液中的蛋白浓度。

使用说明

- 采用 37°C 孵育 30 min 或室温放置 2 h 进行反应, 结果无差异。
- 蛋白溶液中含有物质不同需采用不同的定量方法。

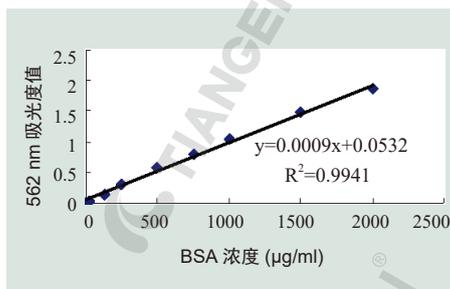
产品简介

BCA 蛋白质定量试剂盒 (BCA Protein Assay Kit) 是根据目前世界上常用的两种蛋白浓度检测方法之一——BCA (bicinchoninic acid) 法研制而成, 实现了对蛋白质进行快速、稳定、灵敏的浓度测定。本试剂盒的原理是蛋白质分子中的肽键结构在碱性环境下能与 Cu^{2+} 络合生成络合物, 将 Cu^{2+} 还原成 Cu^+ , 而 BCA 试剂可敏感特异地与 Cu^+ 结合, 形成稳定的有颜色的复合物, 并在 562 nm 处有光吸收峰值, 该复合物颜色深浅与蛋白质浓度成正比, 可根据吸收值的大小来测定蛋白质的含量。1 h 内即可完成蛋白质定量检测。本试剂盒含有牛血清白蛋白 (BSA) 溶液作为蛋白质标准溶液, 测定范围为 20-2000 $\mu\text{g/ml}$ 。

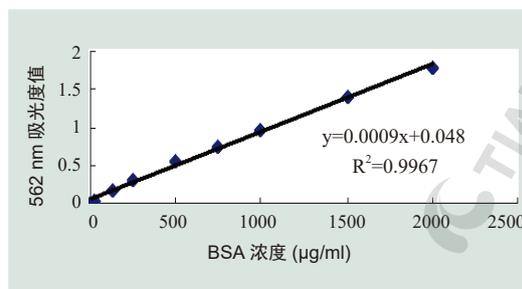
产品特点

- 便捷快速: 与 Lowry 法相比, 该方法可在 1 h 内完成蛋白质定量检测, 工作液配制后 24 h 内使用无影响。
- 灵敏准确: 测定范围是 20-2000 $\mu\text{g/ml}$ (562 nm 读数)。在测定范围内有良好的线性关系, 变异系数小。
- 兼容性好: 与 Bradford 法相比, 对去垢剂耐受能力大为提高, 在 Tween20 低于 4%, NP40 低于 5%, SDS 低于 4%, Triton X-100 低于 4% 的浓度范围内, 即可获得准确定量结果 (其余物质耐受度详见说明书)。使用微板法测定时将体积按比例减小。

实验例



试管检测 BSA 浓度标准曲线



微板检测 BSA 浓度标准曲线

Bradford 蛋白质定量试剂盒

Bradford Protein Assay Kit

——快速灵敏、操作简便、兼容性广

目录号	包装	价格
PA102	100 次 (试管检测)	200 元
	500 次 (微板检测)	

产品组成

试剂盒组成	包装
考马斯亮蓝染液	300 ml
牛血清白蛋白 BSA 标准溶液 (1 mg/ml)	10×1 ml

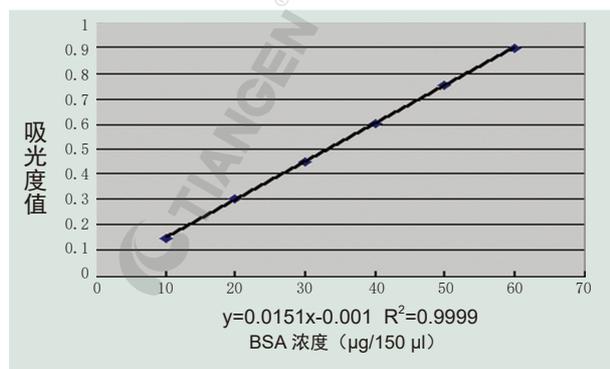
保存条件

考马斯亮蓝: 2-8°C 避光保存

蛋白标准 BSA: -30~-15°C 保存

实验例

用 BSA 制备的标准曲线



产品简介

Bradford 蛋白质定量试剂盒是根据目前世界上常用的两种蛋白浓度检测方法之一: 考马斯亮蓝 G-250 (Coomassie Brilliant Blue G) 法研制而成, 实现了蛋白浓度测定的快速, 稳定和灵敏, 其原理是考马斯亮蓝 G-250 可以在酸性条件下和蛋白质结合产生特殊的蓝色, 吸收波长峰值在 595 nm 处。染色反应可在 5-10 min 内完成, 颜色能保持 30 min 稳定, 因此可通过比色分析在几分钟内快速测定蛋白质含量。本试剂盒含有配制好的考马斯亮蓝溶液和牛血清白蛋白 (BSA) 溶液作为蛋白质标准溶液, 测定范围为 50-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

产品特点

- 快速方便: 即开即用, 操作简便。
- 灵敏准确: 测定范围是 50-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (595 nm 读数), 可检测 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的蛋白质, 在测定范围内有较好的线性关系, 变异系数小。
- 兼容性广: 与其它蛋白浓度测定方法 (如 Lowry 法) 相比, 该方法测定蛋白浓度不受绝大部分样品中的化学物质的影响。样品中的 DTT 浓度可高达 5 mM, 但受略高浓度的去垢剂影响, 需确保 SDS 低于 0.1%, Triton X-100 低于 0.1%, Tween-20, 60 和 80 低于 0.06%, 使用微板法测定时将体积按比例减小。

常见问题及分析

Q 空白对照光吸收值正常, 但标准对照和样品中的吸收值不佳

- A-1** 试剂保存不当
——置于 4°C 保存。
- A-2** 试剂温度过低
——使试剂温度逐渐恢复成室温。
- A-3** 未在正确波长检测吸光度
——在 595 nm 处读数。

Q 样品试管中有沉淀物

- A-1** 样品中含有表面活性剂 (去垢剂)
——透析或稀释样品以去除杂质。
- A-2** 样品未充分混匀或放置时间过长, 与染料形成聚合物
——定量前充分混匀样品。

标签抗体

工作浓度

- Western Blot 杂交 (ECL 显色): 1:200-5000 稀释, 室温孵育 1 h。
- 免疫染色: 1:500-2000 稀释。
- 免疫沉淀、ELISA、Dot Blot: 需通过滴定实验确定合适反应浓度。

适用范围

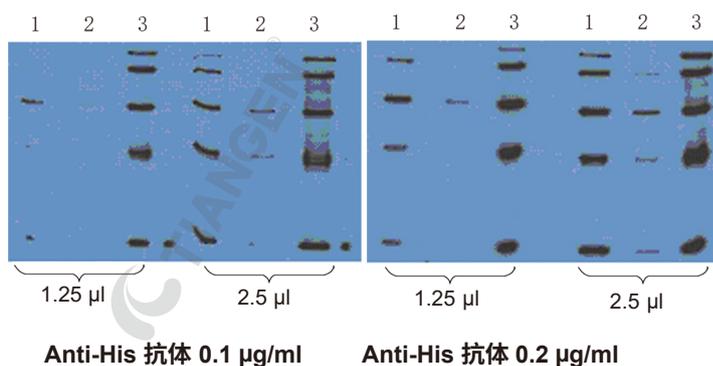
ELISA、Dot Blot、Western Blot、免疫沉淀和免疫染色。

保存条件

-30~-15°C 保存

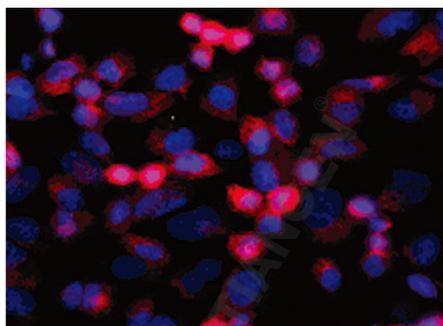
应用举例

- 应用不同公司提供的不同浓度、体积的 anti-His 单克隆抗体检测 His-Tag 蛋白 Marker 融合蛋白显示: Line3 所用的 anti-His 灵敏度显著高于 Line 1 和 2。

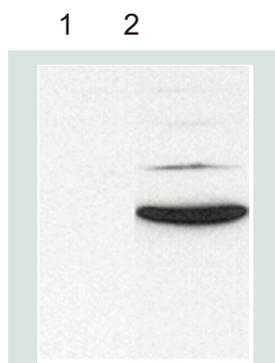


Line1: 进口 anti-His 抗体 -A;
Line2: 进口 anti-His 抗体 -B;
Line3: TIANGEN anti-His 单克隆抗体。

- 应用 TIANGEN Anti-His 检测 His-Tag 融合蛋白。



免疫荧光染色检测 (HEK293 细胞)
红色荧光显示表达的 His-Tag 融合蛋白
(C-末端), 蓝色荧光为细胞核。



Western Blot 检测转染 His-Tag 融合蛋白表达
载体的 HEK293 细胞
1: 未转染表达载体;
2: 转染 His-Tag 融合蛋白表达载体。

Anti-His Antibody

目录号	包装	价格
AB102-02	100 μ l (1 mg/ml)	1180 元

宿主

小鼠，单克隆抗体。

适用范围

ELISA、Dot Blot、Western Blot、免疫沉淀和免疫染色。

工作浓度

- Western Blot 杂交（ECL 显色）：1:200-5000 稀释，室温孵育 1 h（稀释比例与抗原的纯度和量有关，由实验经验值决定）。
- 免疫染色：1:500-2000 稀释。
- 免疫沉淀、ELISA、Dot Blot：需通过滴定实验确定合适反应浓度。

自备试剂

PBS 或 TBS

保存条件

-30~-15 $^{\circ}$ C 保存

产品简介

Anti-His Antibody 为高纯度的小鼠单克隆抗体，属 IgG2b 亚型。适于检测各种商品化编码 6 \times His-Tag 序列的载体表达的含组氨酸标签的蛋白产物。该抗体可高度特异性地结合位于蛋白质 C 末端，N 末端和内部的六个连续组氨酸。在蛋白质免疫相关实验中使用该抗体，可获得特异性高，目的条带清晰的理想的实验结果。

产品特点

- 高纯度、高浓度（1 mg/ml 的抗体浓度）。
- 高特异性：特异检测 HisHisHisHisHisHis 和 C- 末端、N- 末端或内部 His-Tag 融合蛋白。
- 高灵敏度：可检测 1-2 ng His-Tag 融合蛋白（WesternBlot 杂交，ECL 显色）。
- 进口品质，无交叉反应性：与细菌、酵母、昆虫细胞或哺乳动物细胞裂解物无交叉反应。

可溶型单组分 TMB 底物溶液

Soluble TMB Substrate Solution

——灵敏、无毒、使用方便

目录号	包装	价格
PA107-01	100 ml	180 元
PA107-02	5×100 ml	680 元

应用范围

- ELISA。
- 其它通过液体反应检测 HRP 的应用。

自备试剂

0.1M H₂SO₄ 检测试剂

保存条件

2-8°C 避光保存

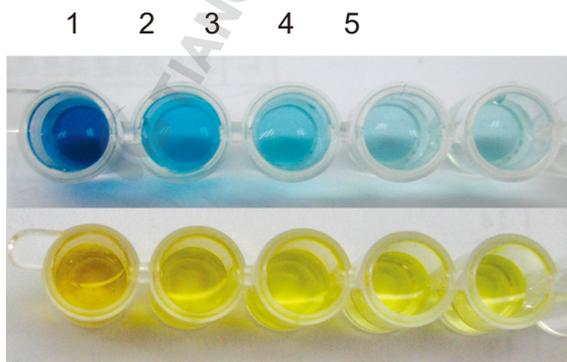
产品简介

在辣根过氧化物酶 (HRP) 的数种颜色反应底物中, TMB 因其灵敏度较高及无致癌性而得到广泛应用。可溶型单组分 TMB 底物溶液与 HRP 反应形成可溶性蓝褐色产物, 反应动力学较常规 TMB 底物快 40% 左右, 适用于通过液体反应快速检测 HRP 的情形如 ELISA。本产品为一步即用型溶液, 无需混合, 方便用户使用。

主要成分

- TMB
- 稳定的过氧化物

应用 TIANGEN 可溶型单组分 TMB 显色试剂盒显色实验



1. 二抗稀释 1:100;
2. 二抗稀释 1:500;
3. 二抗稀释 1:1000;
4. 二抗稀释 1:2000;
5. 二抗稀释 1:3000。

注: TIANGEN IgG-HRP 二抗 ELISA 效价为 1: 500-1000。

增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒

Enhanced HRP-DAB Chromogenic Kit

——操作简便、灵敏度高

目录号	包装	价格
PA110	20× 试剂 A: 2×1.5 ml 20× 试剂 B: 2×1.5 ml 20× 试剂 C: 2×1.5 ml 1×HRP 缓冲液: 60 ml	170 元

应用范围

- Western blot 沉淀。
- 免疫组化。
- 其它通过沉淀反应检测 HRP 的应用。

保存条件

2-8°C 避光保存

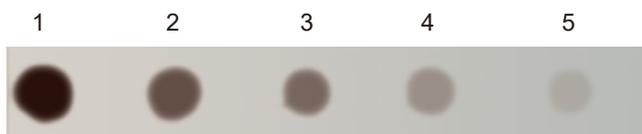
产品简介

TIANGEN 公司研究开发的增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒中含有检测辣根过氧化物酶 (HRP) 的所有试剂, 适合于免疫组化中的组织切片染色或 Western blot 杂交的 PVDF 膜、尼龙膜等的染色。经免疫反应固定的辣根过氧化物酶可以催化底物 DAB 在目的蛋白所在的位置转变为蓝紫色的化合物, 可根据颜色反应来鉴定辣根过氧化物酶的量, 进而确定目的蛋白的位置及含量。

产品特点

- 该显色试剂盒由试剂 A: DAB 底物储存液; 试剂 B: 稳定的过氧化物; 试剂 C: 增色溶液组成。
- 显色过程中需要避光, 在显色后可拍照或扫描。
- 使用 A、B、C 试剂显色后的免疫组织可用 Nuclear fast red 复染。

应用 TIANGEN 增强型 HRP-DAB 显色试剂盒显色实验



1. 二抗稀释 1:100;
2. 二抗稀释 1:300;
3. 二抗稀释 1:500;
4. 二抗稀释 1:1000;
5. 二抗稀释 1:2000。

注: TIANGEN IgG-HRP 二抗 Western blot 效价为 1:400-500。

应用举例



增强型 HRP-DAB 显色试剂盒
应用于 Western blot 实验

Pro-light HRP 化学发光检测试剂

Pro-light HRP Chemiluminescent Detection Reagent

——方便快捷、高灵敏度

目录号	包装	价格
PA112-01	试剂 A: 25 ml 试剂 B: 25 ml	280 元
PA112-02	试剂 A: 2×25 ml 试剂 B: 2×25 ml	520 元

主要成分

溶液 A: Luminol 及特制发光增强剂

溶液 B: 过氧化物及特制稳定剂。

使用说明

将 A 液和 B 液同等体积混匀组成工作液即可使用。

用量以充分覆盖膜或酶标板微孔为基准 (每 10 cm² 膜需要大约 1 ml 工作液, 96 孔酶标板每孔建议使用 100 μl 工作液)。

自备试剂

含 0.05%-0.1% Tween-20 的 PBS、Western Blot 膜封闭液、以合适的稀释比率稀释在封闭液或 PBS 中的一抗、以合适的稀释比率稀释在封闭液或 PBS 中的 HRP 标记的二抗。

保存条件

2-8°C 避光保存

产品简介

Pro-Light HRP 化学发光检测试剂是基于 Luminol 的化学发光底物试剂, 它由辣根过氧化物酶 (HRP) 催化发生化学反应, 发出荧光, 结果可以通过 X 光片压片和其它显影技术展现或使用 Luminometer 检测。

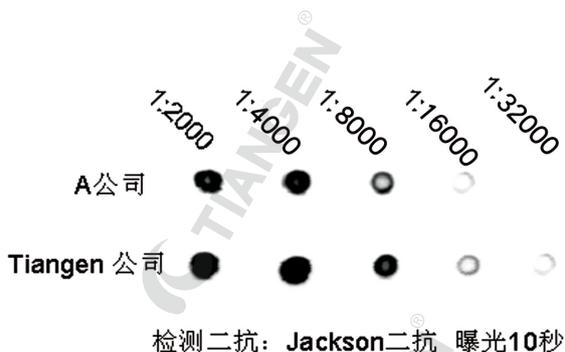
产品特点

- 灵敏度高: 可检测 pico 级抗原。
- 高信噪比, 背景干净。
- 发光迅速, 持续时间达 1 h。
- 可检测低丰度蛋白, 节省抗体 (一抗 1:2000-1:5000; 二抗 1:4000-1:10000)。
- 稳定性好: Pro-Light HRP 化学发光检测试剂在 A 液和 B 液分开的情况下, 4°C 避光可保存至少一年。

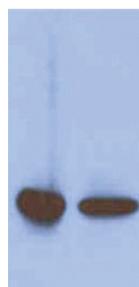
应用范围

Western & Far-Western Blot、ELISA、Southern Blot、Northern Blot、Dot Blot

Pro-Light HRP 化学发光试剂盒, 灵敏度检测实验



应用举例



Pro-Light HRP 化学发光试剂盒
应用于 Western blot 实验

Q&A Western Blot 常见问题分析

Q 转印膜上蛋白样品量少

- A-1** 蛋白质上样量不足或蛋白样品中目的蛋白的含量低
——通过预实验确定合适上样量，保证目的蛋白的量在一抗检测范围内。

Q 转膜效率低

- A-1** 蛋白质变性不充分
——在转移缓冲液中加入 SDS，利于蛋白质的变性和转移。
- A-2** 转移过程中凝胶和转印膜之间存在气泡，使蛋白转移不完全
——操作中使用表面光滑的玻璃棒彻底地赶走凝胶和转印膜之间的气泡。
- A-3** 凝胶和转印膜两侧的滤纸过大互相接触，造成电流直接从滤纸通过，蛋白质没有转移的推动力
——将凝胶和转印膜两侧的滤纸裁成与凝胶一般大小，对齐滤纸、转印膜及两侧的滤纸的四边，避免彼此长出边缘的直接接触。
- A-4** 转印膜过期或不适合
——选用合适合格的转印膜。
- A-5** 电压或电流过小
——严格按照每种蛋白转移装置的要求进行操作。
- A-6** 转印的时间过短
——根据不同的转移装置保证转移的时间。
- A-7** 蛋白转移过程中环境过热
——应配备冷却装置，保证凝胶和膜处于 20℃ 以下。

Q 显色过程中无条带出现

- A-1** 所使用的第一抗体、第二抗体及显色方法不合适
——选择适于目的蛋白的第一抗体；适于第一抗体的第二抗体；适于第二抗体的显色方法。
- A-2** 封闭液中起封闭作用的物质过浓
——降低起封闭作用物质的浓度。
- A-3** 目的条带含量低于一抗的检测灵敏度
——使用合适方法增加目的条带的含量。
- A-4** 一抗的效价低或稀释倍数过大
——增加一抗的浓度即减少稀释倍数。
- A-5** 二抗的效价低
——增加二抗的浓度即减少稀释倍数。
- A-6** 显色剂底物浓度不足
——增加显色剂的用量。
- A-7** 一抗或二抗的作用时间不足
——相应地增加作用时间，保证在 37℃ 作用的时间在 1h 以上。

A-8 一抗或二抗后洗涤的时间和次数过长
——减少洗涤次数和时间，以 37°C，5-10 min，三次为好，可以酌情增减。

A-9 显色剂失效
——用二抗直接检测显色剂。

Q 显色背景过高

A-1 封闭液中封闭物质不足
——增加起封闭作用的物质的浓度。

A-2 转印膜未能完全的被封闭液所覆盖，膜上的非蛋白样品的部位暴露未能被封闭物质占据
——注意使封闭液完全的覆盖转印膜的每一部份。

A-3 封闭的时间和温度不够
——37°C下至少应轻轻振摇封闭 2 h 以上或 4°C过夜。

A-4 一抗为多克隆抗体，与非目的条带也有作用
——适当的减少一抗的浓度和作用的时间，增加洗涤的次数。

A-5 二抗浓度过高洗涤不彻底
——降低二抗的浓度，适当增加洗涤的时间。

A-6 化学显色底物过多
——按照说明适量加入显色剂各种成分。

A-7 二抗的显色时间过长（如辣根过氧化物酶）
——如果选用的是在短时间内褪色的二抗显色法应注意避光显色时间不宜太长，显色后即拍照留图。

Q 条带信号弱

A-1 一抗或二抗浓度低
——减少一抗及二抗的稀释倍数或增加作用的时间。

A-2 目的条带量少于一抗检测的灵敏度
——浓缩目的蛋白或增加上样用量。

WorkBeads™ 40 Ni Bulk Media

——应用于高通量 His-tag 重组蛋白分离纯化

目录号	包装	价格
WM6-40 650 001	25 ml	询价
WM6-40 650 003	150 ml	询价
WM6-40 650 010	1 L	询价

性能参数

琼脂糖含量 (%)	7.4-7.8
金属离子载量 ($\mu\text{eqv Ni}^{2+}/\text{ml}$)	40-50
颗粒大小 (μm)	32-60
最大流速 (20 cm 柱床, 5Bar 压力)	>500 cm/h
pH 稳定性	pH 2-14
化学稳定性	100% 甲醇, 100% 乙醇, 8M 尿素, 6M 盐酸胍, 30% 乙腈, 70% 甲酸, 30% 三氟乙酸

产品简介

WorkBeads™ 40Ni 采用了专利技术的交联方法。该产品可以承受高流速以及拥有非常好的物理稳定性。琼脂糖为基质的填料已经应用于工业生产几十年, 其与生物分子(如蛋白质, 核酸, 以及糖类等)相容性好并且特异性高。另外人工合成材料的基质存在许多微孔, 这会导致柱子微环境 pH 值的变化, 而琼脂糖基质没有微孔, 这大大地提高了柱子的分离效果。该填料采用溴醇方法活化, 在 Ni 离子和琼脂糖基质之间存在一个间隔臂。WorkBeads 40Ni 已经预螯合了 Ni, 因此用户只需将琼脂糖装入柱中即可以直接进行重组蛋白的分离纯化。该填料温保存在 22% 的乙醇中, 经过冲洗后可以直接使用。

产品特点

- 以琼脂糖为基质的填料, 在生物行业中广泛应用。
- 非常高的蛋白载量, 可以高达 60 mg/ml。
- 高特异性, 高纯度。
- 高流速 >500 cm/h。

BabyBio Ni-NTA 预装柱

BabyBio Ni-NTA column

——一种方便, 快速的 His 标签重组蛋白预装柱



目录号	包装	价格
WM6-45-655-101	1 ml	询价
WM6-45-655-105	5 ml	询价

产品包装

试剂盒组成	WM6-45-655-101	WM6-45-655-105
BabyBio Ni-NTA column	1 ml	5 ml

保存条件

置于室温 (15-30°C) 干燥条件下

产品简介

BabyBio Ni-NTA 为 Bioworks 公司隆重推出的新一代预装柱产品品牌。目前包含的规格为 1 ml/5 ml。用于快速、方便地纯化 His 标签重组蛋白。

BabyBio Ni-NTA 包含了专门为 His 标签蛋白纯化而研制的 Ni-NTA 琼脂糖基质 workbeads。Workbeads 为交联的琼脂糖, 其物理性质非常稳定, 非常适合在高流速下进行蛋白纯化。

产品特点

- 快速纯化 His 标签蛋白。
- 更高的载量以及纯度。
- 操作简单容易并且结果重复性高。