

Cell-Free Protein Synthesis Kit For VHH

REF: EG26310-S/M

储存条件

-80℃保存，有效期 12 个月。

本试剂盒采用干冰运输。试剂盒开封后，请将蛋白表达反应组分（A 液、B 液）置于 -80℃保存。为避免反复冻融导致蛋白合成活性下降，建议将 A 液和 B 液按单次使用量分装，经液氮速冻后储存于 -80℃。

产品组成

组分	规格 S	规格 M
Solution A	300 µl	2×750 µl
Solution B	600 µl	3×1 ml
CFPS-Control Plasmid I	2 µg	2 µg
CFPS-Control Plasmid II	2 µg	2 µg

产品简介

Cell-Free Protein Synthesis Kit For VHH 是一款专为纳米抗体（VHH）体外表达优化的无细胞蛋白合成试剂盒，基于基因工程改造的大肠杆菌提取物构建偶联转录 - 翻译系统，以 T7 RNA 聚合酶驱动目标基因的高效表达；本试剂盒针对 VHH 分子小、富含二硫键、易聚集等特点，优化了氧化还原环境、分子伴侣组分及反应缓冲液配方，可在数小时内获得可溶性好、折叠正确、保留抗原结合活性的 VHH 蛋白，支持质粒 DNA 或线性 DNA 模板，兼容微孔板高通量筛选与放大制备，广泛适用于 VHH 快速表达验证、突变体筛选、蛋白制备及功能学研究等场景。

适用范围

产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。

操作说明

1. 基因构建

CFPS-Control Plasmid II 为本试剂盒配套的 VHH 表达阳性对照质粒，同时可用作通用克隆载体骨架。质粒携带 T7 启动子驱动的 VHH 表达框，用户可根据实验需求，通过限制性酶切或同源重组方式替换其中的 VHH 编码序列及标签序列，构建目标蛋白表达质粒。该质粒（DNA 序列详见质粒图谱，官网可下载）功能元件分布如图 1 所示，各元件说明如下：

translation enhancer：编码 MSKIK 氨基酸序列，位于翻译起始区，通过增强核糖体招募与翻译起始复合物组装效率，显著提升目标蛋白的表达产量；

GFP11：基于分裂 GFP (split-GFP) 技术的荧光检测标签，本身无荧光，与 GFP1-10 片段（本试剂盒未包含，需另行采购）互补后重构完整 GFP 并发射荧光，可用于蛋白表达水平的快速定量检测，无需电泳或 Western Blot；

Strep II：八氨基酸亲和纯化标签（WSHPQFEK），与 Strep-Tactin/Strep-Tactin XT 树脂特异性结合，较 His 标签具有更高的结合亲和力、更低非特异性背景，且洗脱条件温和（生物素竞争洗脱），可最大程度保留蛋白活性，推荐作为 VHH 纯化的首选标签。

用户构建自定义 VHH 表达载体时，建议对 VHH 基因进行大肠杆菌密码子偏好性优化，提升翻译效率与蛋白表达量。建议优先采用 CFPS-Control Plasmid II 质粒骨架，其 N 端翻译增强元件 SKIK 四肽（融合保留于成熟蛋白）搭配 C 端 GFP11，能够显著提升 VHH 蛋白表达稳定性。Strep II 标签也可替换为 6×His 标签，适配 Ni-NTA 等纯化介质，优先推荐使用 Strep II 标签。



图 1 CFPS-Control Plasmid II 功能元件

2. 模板制备

本试剂盒支持质粒 DNA、线性 PCR 产物及 RCA（滚环扩增）产物三种类型的 DNA 模板用于 VHH 表达。初次表达或条件优化阶段推荐使用质粒模板，其表达稳定性高、重复性好；线性 PCR 产物无需克隆步骤，操作灵活快捷，适合高通量筛选场景；RCA 产物可通过等温扩增快速获得大量 DNA 模板，适合需放大制备的反应体系。各类模板的具体操作流程及注意事项详见《无细胞蛋白表达试剂盒技术手册》。

3. 无细胞蛋白表达

按反应体系总体积及 A 液：B 液 = 1:2 (v/v) 的比例计算各组分用量，在冰浴条件下依次将试剂加入反应容器（如 2 ml 离心管）中，轻柔吹打混匀。全程操作需佩戴手套及口罩，使用无核酸酶 (nuclease-free) 的移液器吸头与反应容器，避免核酸酶污染导致模板降解。反应体系配制可参照下表，轻柔混匀后将反应容器置于恒温摇床中，于 26℃、200 rpm 条件下进行体外蛋白表达，推荐反应时间为 16 h。

表 2 反应体系的配制

组分	终浓度	50 µl 体系	100 µl 体系
Solution A	30%	15 µl	30 µl
Solution B	60%	30 µl	60 µl
模板	5~10 µg/ml	5~10 µg/ml	5~10 µg/ml
无核酸酶水	\	补足至 50 µl	补足至 100 µl

4. 检测

反应结束后，可取约 1 μ l 反应液（检测总蛋白）或反应上清（检测可溶性蛋白）进行 SDS-PAGE 电泳，分析目的蛋白的表达情况。本试剂盒中 VHH 的典型表达量为 0.1~0.5 mg/ml；若表达量偏低或电泳染色效果不佳时，目的蛋白条带可能不明显，易造成“未表达”的误判。遇此情况，建议对样品进行纯化富集后再电泳检测。

若表达载体携带 GFP11 标签，可采用灵敏度更高的 split-GFP 技术进行快速荧光检测：取适量反应液与 GFP1-10 蛋白（本试剂盒未包含，需另行采购）混合孵育，通过荧光强度定量分析目的蛋白的表达水平，无需电泳操作。

5. 纯化

取 100 μ l CFPS 反应上清，加入 50 μ l 预平衡的 Strep-Tactin 磁珠，4 $^{\circ}$ C 旋转孵育 2 h。将反应管置于磁力架上，待磁珠完全吸附后弃去上清。用 100 μ l 洗涤缓冲液洗涤磁珠 3~6 次，每次磁力架分离后弃上清。最后加入 50 μ l 洗脱缓冲液，室温孵育 3~5 min，磁力架分离后收集上清，即为纯化的 VHH 蛋白。具体操作参见磁珠产品的使用说明书。