

蛋白表达试剂配置

(一) 蛋白表达常用培养基

1. 600ml TB 培养基

Tryptone 7.2g, yeast 14.4g, 甘油 3g, 磷酸氢二钾 9.86g, 磷酸二氢钾 1.4g, 去离子水搅拌溶解, 定容至 600ml (可分装成两瓶使用), 其他量依次放大;

2. 100ml LB 液体培养基

Tryptone 1g, yeast 6g, 氯化钠 1g, 去离子水溶解搅拌, 定容至 100ml; 其他量依次放大;

固体 LB 培养基, 按照 1.5%的量加入琼脂

3. 600ml 2xYT 培养基

Tryptone 9.6g, yeast 6g, 氯化钠 3g, 去离子水搅拌溶解后定容至 600ml; 其他量依次放大;

4. 100ml MD 选择培养基

在 80ml 的去离子水中加入 2g 琼脂糖, 120 度灭菌 20min, 温度下降 60°C 之后, 超净台加入 10ml 10xYNB (13.4g/L), 10ml 的 10x 葡萄糖 (20g/L), 0.2ml 的 500x 生物素 (4×10^{-4} g/L);

5. 100ml MM 选择培养基

在 90ml 的去离子水中加入 2g 琼脂糖 (20g/L), 120 度灭菌 20min, 温度下降 60°C 之后, 超净台加入 10ml 10xYNB (13.4g/L), 0.2ml 的 500x 生物素 (4×10^{-4} g/L), 0.5ml 甲醇 (0.5%);

6. 10xYNB

134gYNB 固体溶于 1L 的去离子水中, 过滤灭菌, 4°C 保存;

7. YPD 完全培养基

Tryptone 20g/L, yeast 10g/L, 葡萄糖 20g/L, 固体培养基添加 1.5%的琼脂;

8. RDB 转化培养基

山梨醇 186g/L, 琼脂糖 20g/L, 120 度灭菌 20min, 温度下降 60°C 之后, 超净台加入 10ml 10xYNB (13.4g/L), 10ml 的 10x 葡萄糖 (20g/L), 0.2ml 的 500x 生物素 (4×10^{-4} g/L), 100xAA 1ml, 搅拌混匀, 倒平板 (配置 100ml 灭菌时加入 80ml 水即可);

9. 100xAA (每种氨基酸 0.5%)

准确称取 L-谷氨酸, L-亮氨酸, L-异亮氨酸, L-赖氨酸, L-甲硫氨酸各 500g 溶于 100ml 去离子水中, 过滤灭菌, 4°C 保存;

10. BMGY 诱导表达培养基

Tryptone 20g/L, yeast 10g/L, 磷酸氢二钾 3g/L, 磷酸二氢钾 11.8g/L, 加水至 890ml, 120 度灭菌 20min, 温度下降 60°C之后, 超净台加入 10ml 10xYNB (13.4g/L), 1ml 的 500x 生物素 (4×10^{-4} g/L), 甘油 10ml ;

11. BMMY 诱导表达培养基

Tryptone 20g/L, yeast 10g/L, 磷酸氢二钾 3g/L, 磷酸二氢钾 11.8g/L, 加水至 895ml, 120 度灭菌 20min, 温度下降 60°C之后, 超净台加入 10ml 10xYNB (13.4g/L), 1ml 的 500x 生物素 (4×10^{-4} g/L), 甲醇 5ml ;

12. 500x B (0.02%生物素)

生物素 20mg/100ml 去离子水, 过滤灭菌, 4°C保存 ;

13. 10xBasal Salts 发酵培养基

NH₄H₂PO₄ 50g/L, CaSO₄ 0.93g/L, K₂SO₄ 18.2g/L, MgSO₄·7H₂O 14.9g/L, KOH3g/L, 葡萄糖 50g/L, 磷酸二氢钾 5g/L ;

上述培养基 YNB, 甲醇, 生物素, 氨基酸过滤除菌, 葡萄糖 108°C灭菌 30min, 其余 120°C高压灭菌 20min ;

14. SDS-PAGE 凝胶配置

A 液 : 丙烯酰胺 29.2g, 甲叉双丙烯酰胺 0.8g, 去离子水搅拌溶解, 定容至 100ml ;

B 液 : Tris 18.2g, 加 800ml 去离子水, 调 pH 至 8.8, 加入 4ml 10% SDS, 定容至 100ml ;

C 液 : Tris 6.05g, 加 30ml 的去离子水, 调 pH 至 6.8, 加入 2ml 10% SDS, 定容至 50ml ;

D 液 : 10% SDS

AP : 10%过硫酸铵 : 5g (0.5g) 过硫酸铵, 溶于 50mL (5mL) 去离子水中 ; 现配现用或分装至 0.5mL 离心管中冷冻备用。

TEMED : TEMED (N-N-N`-N` - 四甲基乙二胺) 原液, 低温保存。

不同浓度的 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离胶配置

溶液成分	不同体积的凝胶各成分的体积 (ml)								
	5	10	15	20	25	30	40	50	
6 %									
水	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5	
30% A 液	1	2	3	4	5	6	8	10	
1.5mol/L Tris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5	
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5	
10% AP	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5	

TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
12%								
水	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
30% A 液	2	4	6	8	10	12	16	20
1.5mol/L Tris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% AP	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15 %								
水	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5
30% A 液	2.5	5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
1.5mol/L Tris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% AP	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

15. 琼脂糖凝胶配置

根据要分离的样品 (DNA) 大小配制合适浓度的琼脂糖凝胶。准确称取一定量的琼脂糖干粉, 加入到合适体积的锥形瓶中, 加入一定量的电泳缓冲液 (30ml 左右 TAE) ; 放入到微波炉内加热融化, 冷却片刻 (不烫手即可) ; 融化后的琼脂溶液摇晃混匀, 倒入电泳槽中, 等其凝固; 室温下凝固 30-40min 左右, 小心的拔出梳子, 取出凝固好的凝胶 4°C 保存;

(二) 常用缓冲液

1. SDS-PAGE 电泳缓冲液

配制 1L, 在 1L 烧杯中准确称取 Tris3.0g, 甘氨酸 14.4g, SDS1.0g, 去离子水搅拌溶解, 定容至 1L;

2. Western blot 转膜缓冲液

配制 1L，在 1L 烧杯中准确称取 Tris 5.8g，甘氨酸 2.9g，SDS 0.37g，甲醇 200ml，加入去离子水搅拌溶解，定容至 1L；

3. SDS-PAGE 上样缓冲液，

① 5xLoading buffer

配制 50ml，在 1L 的烧杯中，准确称取 Tris 0.9g，甘油 32.5g，SDS 5g，DTT 2.75g，溴酚蓝 0.125g，加入适量去离子水搅拌溶解，定容至 50ml；

② 2xLoading buffer

配制 50ml，在 1L 的烧杯中，准确称取 60mM Tris 0.36g，20%甘油 13g，4% SDS 2.0g，150mM DTT 1.10g，0.1%溴酚蓝 0.05g，加入适量去离子水搅拌溶解，定容至 50ml；

4. SDS-PAGE 电泳染色液

R250 (1L)：在合适体积的烧杯中，准确称取 R250 1.0g，甲醇 450ml，乙酸 100ml，充分的溶解。

5. SDS-PAGE 电泳脱色液、

1L：冰乙酸 100ml，甲醇 100ml，充分混匀，室温放置；

6. 1X PBS pH7.4

500ml 1XPBS，在合适体积的烧杯中，准确称取 140mM 氯化钠 4.1g，2.7mM 氯化钾 0.1g，10mM NaH₂PO₄·12H₂O 1.79g，1.8mM 磷酸二氢钾 0.122g，用 480 左右 ml 去离子水搅拌溶解，调 pH 为 7.4，定容至 500ml；

7. 1xTAE

配置 500ml 1xTAE，准备合适体积的烧杯，准确称取 Tris 2.42g，乙酸 0.571ml，EDTA (Na) 0.186g，加入去离子水搅拌溶解，定容至 500ml；

更多优质服务推荐

1

SingleB® mAb Discovery Service

SingleB®单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务,利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台,实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象,从动物免疫到获得单抗,快至29天,比传统杂交瘤技术至少节省120天。

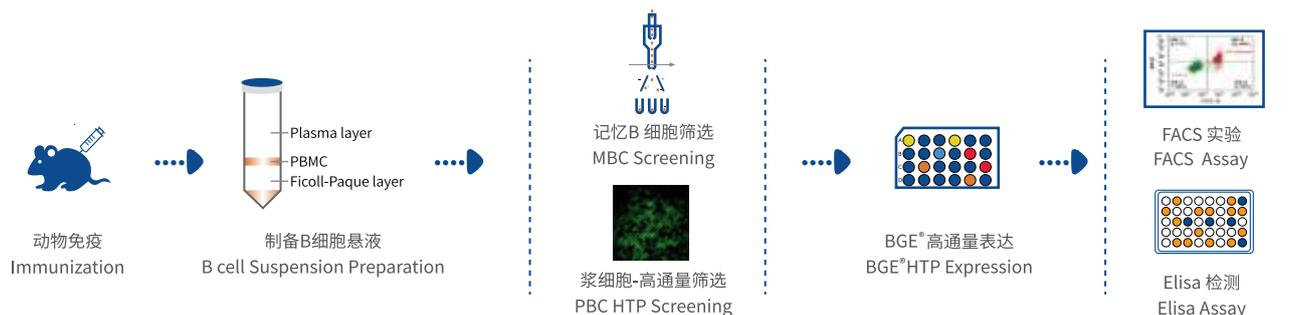
平台优势

- 支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫
- 记忆B细胞 & 浆细胞双筛选,保证B细胞多样性
- 单细胞扩增阳性率高,无需刺激培养,减少多样性损失
- 重轻链天然配对,亲和力更优
- 高通量,周期短,单抗发现快至29天
- ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种



服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、(Fab')₂、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势



服务流程

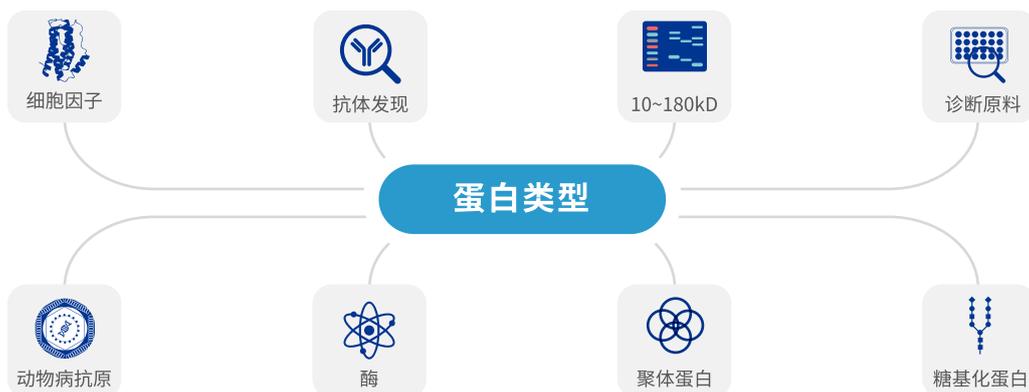


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4

Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术,能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

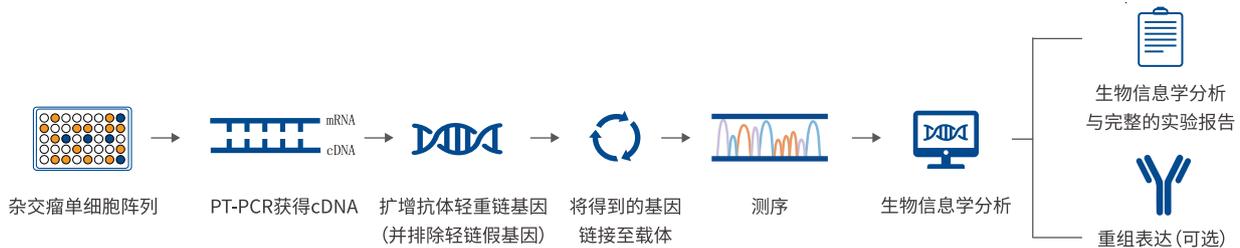
应用场景

- 抗体序列保护:获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份:杂交瘤存在退化转阴风险,抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造:获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验:测序5天,表达5天,全程高通量
- 细胞需求少:只需1~5个细胞,可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确:采用Failsafe®假基因排除技术,可排除κ轻链假基因
- 测序范围广:可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务:德泰生物拥有丰富经验,可提供表达验证服务

服务流程



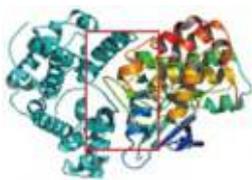
5

Biomolecular Interaction Analysis Service

分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down, 免疫共沉淀, 酵母双杂交等相比, 具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

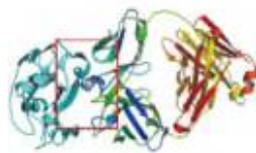
检测范围



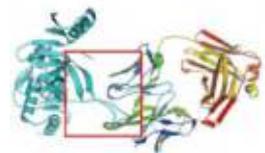
蛋白和蛋白



蛋白和小分子



蛋白和抗体



蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。

6

Antibody Humanization Service

抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势



重链和轻链同时参与优化



改造后的抗体人源化程度>90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

- 1 Antibody sequence confirmation
- 2 Human germline acceptor selection
- 3 CDR grafting
- 4 Back mutation
- 5 Mutation energy ranking
- 6 Antibody expression
- 7 Affinity ranking

7

Stable Cell Line Development Service

生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

服务流程



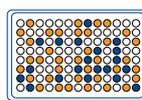
基因合成&质粒抽提



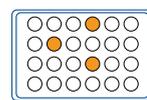
稳定转染



On-chip筛选



压力筛选



扩大培养



交付单克隆细胞株

服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株
较传统方法快近100天



百k级筛选通量

一次筛选640k细胞
优选高表达细胞株



可视化筛选结果

先进DeepLight®平台
高表达细胞株实时成像



稳定高产

可稳定转代50代
重组单抗可达5 g/L