

基因合成的原理与应用

摘要:基因合成是体外合成双链 DNA 的一种方法,是获取目的基因的手段之一,本文主要介绍了不同获取目的基因的方法及基因合成的原理、应用与优势。

人工合成基因出现在上世纪 60 年代,通过基因合成,可以获得自然界中不存在的基因。目前,获取目的基因的方法主要有三种:逆转录,PCR 扩增,人工合成 。逆转录法主要适用于获得分子量较大的未知序列的基因,它以目的基因的 mRNA 为模板,设计上下游引物,借助逆转录酶合成碱基互补的 DNA 链(即 cDNA),在 DNA 聚合酶的作用下合成 cDNA,即目的基因的双链 DNA。PCR 主要适用于已知序列的扩增,获得大量的目的片段,供人们肉眼观察(RT-PCR 可实现对起始模板的定量分析)。人工合成法就是采用化学合成的方法获取目的片段,化学合成准确率较高,速度较快,同时根据不同的下游应用和密码子的偏爱性,设计基因序列,提高表达水平。

原理

DNA 合成的方法主要采用固相亚磷酰胺三酯法,运用此方法的 DNA 合成仪有很多,常用的有 ABI 394 合成仪、ABI39OO 高通量合成仪,它们的区别主要在合成效率,试剂用量,耗时等方面,合成的原理是相同的,合成原理如图:

Step 1:DMTro 是 5' 羟基的保护基团,用 TCA (三氯乙酸)和预先连接在固相载体(CPG)上的核苷酸的 5' 端发生反应,脱去 DMT,使 5' 羟基端游离

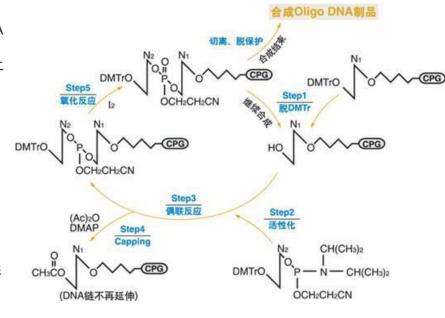
Step 2:亚磷酰胺保护的 dNTP 和活化剂四氮 唑混合,得到核苷亚磷酸活化中间体,此时 3′端被活化,5′-羟基被 DMTro 保护

Setp 3:1、2步的产物发生缩合反应偶联,形

成新键 C-亚磷酯键

Setp 4:1 中会剩下部分未参与反应的 5'-羟基,通过乙酰化的方法封闭 5'-羟基

Setp 5:3 步形成的 C-亚磷酯键不稳定,易被水解,所以用氧化剂碘将其氧化成更稳定的磷酸三酯键





通过以上步骤,一个脱氧核苷酸被连接到固相载体上,将其 5′端的 DMTro 切除,重复以上步骤合成所有需要的碱基,最后经过氨水高温处理,将合成的链从固相载体 CPG 上切下来,根据不同的下游应用纯化处理后保存。 PCR 扩增简单方便,但不能保证基因序列的完全正确性,扩增存在突变风险,且 PCR 对模板也具有一定的要求,因此适用性存在局限性,相对于此基因合成具有如下优势:

优势

- 1. 可以保证基因序列的完全正确性,无突变
- 2. 合成周期短
- 3. 不受模板来源限制
- 4. 根据不同应用,设计优化基因序列,提高表达水平

应用

人工基因合成具有极大的灵活性,根据需求自行改变设计序列

- 1. 进行基因优化,提高基因表达
- 2. 合成已知序列的难扩增基因
- 3. 合成大量用于微芯片的 cDNA
- 4. 克隆人鼠抗体或重组抗体
- 5. 设计合成基因疫苗、基因治疗载体
- 6. 根据基因的结构功能研究,修改设计基因
- 7. 合成不同的基因突变株、SNPS、或其它突变株

更多优质服务推荐



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

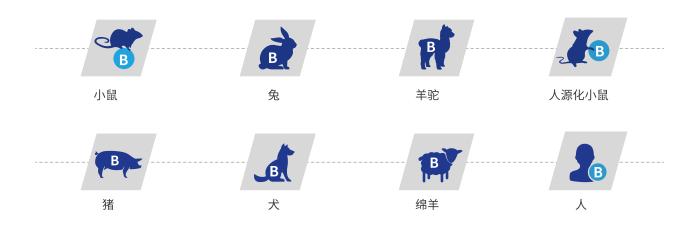


高通量,周期短,单抗发现快至29天

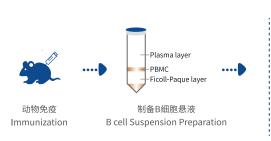


ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种



服务流程











BGE®高通量表达 BGE®HTP Expression



FACS Assay



Elisa 检测 Elisa Assay



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lgG、lgM。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





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。





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。

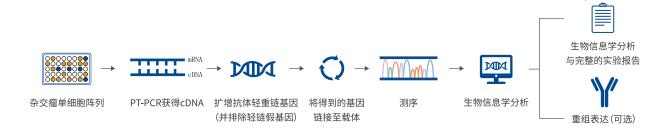
应用场景

- 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lgM和lgG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

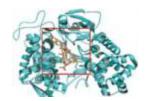


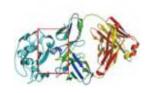


德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down,免疫共沉淀,酵母双杂交等相比,具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

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。



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



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



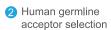
改造后的抗体人源化程度>90%



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

















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	

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