

双向凝胶电泳

双向凝胶电泳, 广义上理解就是将某一样品进行电泳后, 为了达到不同的分离目的在它的直角方向在进行一次电泳。常用的就是等电聚焦电泳(载体两性电解质 pH 梯度或固相载体 pH 电泳)之后在进行 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳。样品经过电荷和质量两次分离之后, 可以知道样品的分子量等电点等信息, 分离的结果不是带而是点。

以等电聚焦--聚丙烯酰胺凝胶电泳为例的实验操作



双向凝胶电泳实验步骤

(一) 水化上样

1. 从冰箱中取出 IPG 胶条, 室温下放置 10min ;
2. 沿着水化槽的边缘从左向右加入样品(槽两端各 1cm 不加样品), 中间样品液一定要连贯, 不要产生水泡, 不然会影响胶条中蛋白质的分布 ;
3. 用镊子轻轻撕去 IPG 胶条的保护层(碱性端胶脆弱, 应该小心操作) ;
4. 将 IPG 胶条胶面朝下轻轻置于水化盘中样品液上(不要将样品液弄到胶条背面, 因为这些溶液不会被胶条吸收, 还会使胶条下面产生气泡, 如果有气泡, 来回移动胶条, 直到赶走气泡)
5. 放置 40min, 直到大部分的样品被胶条吸收, 慢慢加入矿物油, 防止胶条水化过程中液体蒸发
6. 将等电聚焦仪放于-20℃, 水化 11-15 小时。

(二) 等电聚焦

1. 将纸电极置于聚焦盘的正负极上，加去离子水 5-8ul；
2. 取出水化好的胶条，将矿物油沥干，胶面朝下，将其置于润湿好的滤纸片上去除表面的不溶物；
3. 将 IPG 胶条面朝下置于聚焦盘中，胶条的正极对应于聚焦盘的正极，确保胶条与电极精密接触；
4. 在每根胶条上滴 2-3ml 的矿物油；
5. 对好正负极，盖好盖子。设置等电聚焦程序；
6. 聚焦结束的胶条，立即进行平衡，第二向 SDS-PAGE 电泳或者是保存于-20℃，电泳前 10min 时取出。

(三) SDS-PAGE 电泳

1. 配制 12% 的丙烯酰胺凝胶；
2. 配制胶条平衡缓冲液；
3. 准备厚的滤纸，聚焦好的胶条胶面朝上放在干的厚滤纸上，将另一份厚滤纸用 Millio 水浸湿，汲取多余水分，然后直接置于胶条上，轻轻吸干胶条上的矿物油及多余样品，这样可以减少凝胶染色时出现的纵条纹；
4. 将胶条转移至样品水化盘中，加入 6ml (17cm IPG) 平衡缓冲液 I，在水平摇床上摇晃 15min；
5. 配制胶条平衡缓冲液 2，第一次平衡技术后，滤纸上离去多余的液体，放在平衡缓冲液 2 中，继续在水平摇床上缓慢摇晃 15min；
6. 用滤纸吸去 SDS-PAGE 胶上方玻璃板间多余的液体，将第二向凝胶放在桌面上，凝胶的顶部面对自己；
7. 琼脂糖液体加热溶解，在 100ml 量筒中加入 TGS 电泳缓冲液；
8. 第二次平衡结束，取出胶条，用滤纸吸去多余的平衡液，用镊子夹住胶条一端，使胶面完全浸入在电泳缓冲液中漂洗几次；
9. 将胶条背面朝向玻璃板，轻轻放在长玻板上，加入琼脂糖封胶液；
10. 注意不要在胶条下产生气泡，将胶条和聚丙烯酰胺凝胶面完全接触；放置几分钟，待琼脂糖凝固；
11. 打开二向电泳制冷仪，调温度至 15℃；
12. 将凝胶电泳转移至电泳槽中，加入电泳缓冲液，接通电源，一开始低电流，待样品完全走出 IPG 胶条，浓缩成一条线后，加大电流，溴酚蓝指示剂到达底部边缘时停止电泳；进行染色观察。

更多优质服务推荐

1

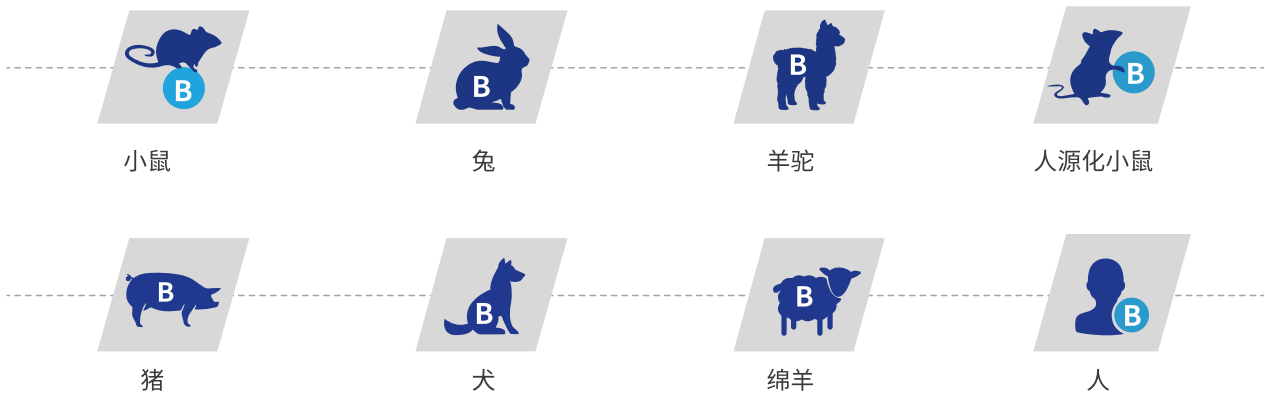
SingleB® mAb Discovery Service SingleB®单B细胞快速单抗发现

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。

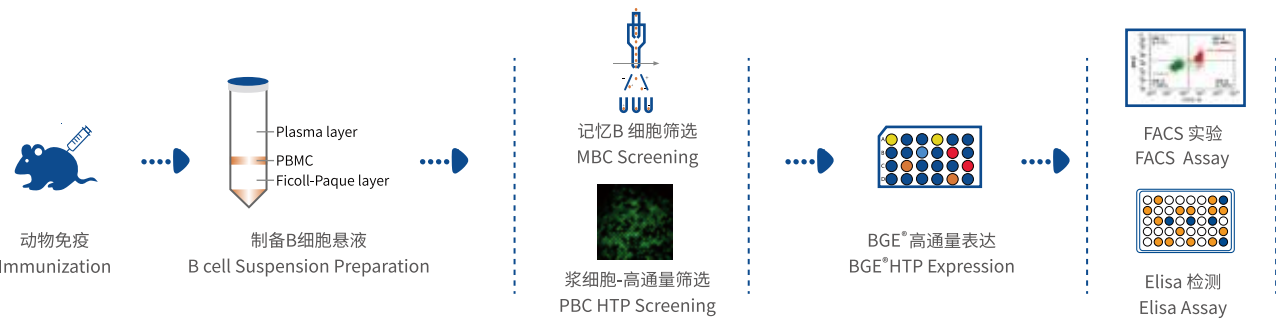
平台优势

 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

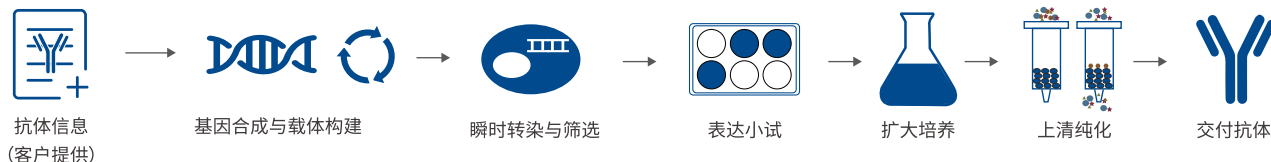
重组抗体表达

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、 $(\text{Fab}')_2$ 、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

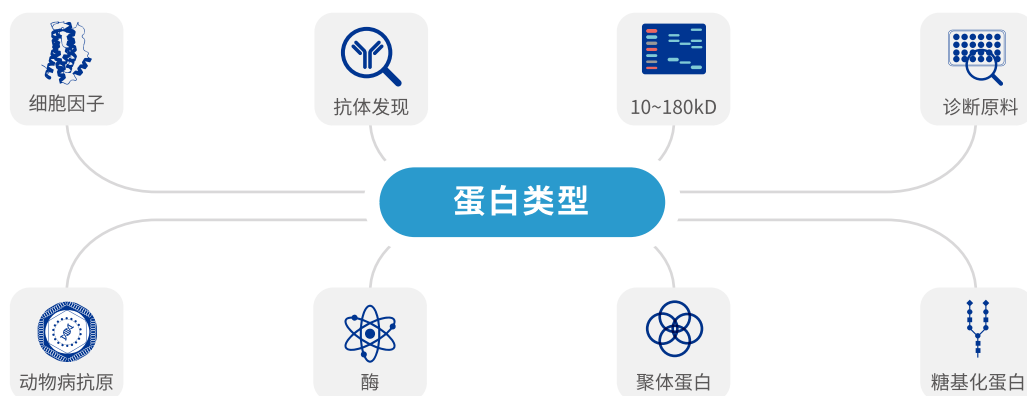


Recombinant Protein Expression Service

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。

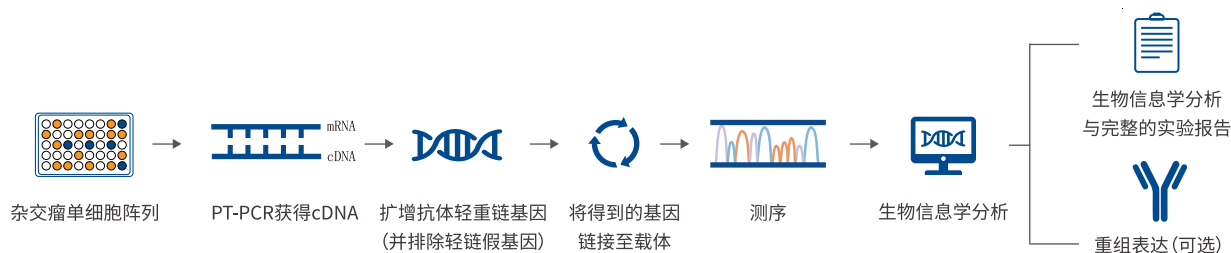
应用场景

- 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k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



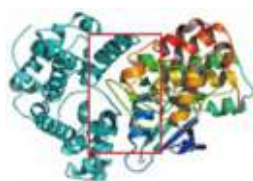
5

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。



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



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



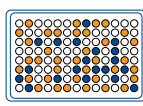
基因合成&质粒抽提



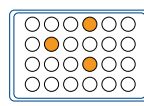
稳定转染



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