

大肠杆菌蛋白表达感受态细胞的制备

感受态细胞的概念

感受态，是指宿主细胞最容易接受外源基因并实现将其转化的一种生理状态，它是由受体菌的遗传性状所决定的，同时也受菌龄以及外界环境因子的影响，比如 Ca^{2+} 就可以大大促进转化的作用。细胞的感受态一般出现在对数生长期，新鲜幼嫩的细胞是制备感受态细胞和进行成功转化的关键。

感受态细胞制备的原理

制备感受态细胞最常用的方法是用预冷的 CaCl_2 处理对数生长期的细菌，即用低渗 CaCl_2 溶液在低温（ 0°C ）时处理快速生长（进入对数生长期）的细菌，从而获得感受态细胞。此时细胞膨胀成球形，外源 DNA 分子在低温条件下易形成抗 DNA 酶的羟基 - 钙磷酸复合物粘附在细胞表面，通过热激处理促进细胞对外源 DNA 分子的吸收。转化效率非常高。此方法的关键在于选用的细胞必须处于对数生长期，实验操作必须在低温无菌环境下进行。

大肠杆菌感受态细胞的制备实验

1、实验仪器及试剂

仪器：超净工作台，摇床，高压灭菌锅，培养箱，制冰机，超低温冰箱，离心机，接种环，试管，摇瓶（2L），平板，移液枪，枪头，离心管（500mL），EP 管（1.5mL），蓝盖瓶，泡沫箱

试剂： CaCl_2 溶液：PIPES 1.51g， $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4.41g，甘油 75ml，pH=7.0，定容至 500ml。

LB 培养基（固体、液体）：Tryptone 1.00g，Yeast 0.50g，NaCl 1.00g，定容至 100ml。（固体培养基加入 1.5% 的琼脂）

抗性：卡那霉素，氨卞青霉素，氯霉素，四环素。

- 材料：感受态菌株

2、实验方法及操作步骤

- 取 - 80°C 冻存的感受态菌株，用接种环划线分离接种于固体平板上（平板抗性根据感受态选择），做好标记，倒置于 37°C 培养箱培养过夜。

- 第二天，从平板上挑取单个菌落，接种至含有 4ml LB 培养液（抗性根据感受态选择）的试管中，37℃，195rpm，震荡培养过夜。次日取菌液 4ml 接种至含有 400ml LB 培养基（抗性根据感受态选择）的 2L 摇瓶中，37℃，200rpm 震荡培养约 2-3 小时。
- 当菌落 OD_{600nm} 值达到 0.3 - 0.5 时，将摇瓶取出放置于冰上 10-15min。在无菌条件下把菌液倒入 500ml 的预冷的离心管中，离心 4℃, 3000r，8min。
- 弃去上清，加入约 200ml 的预冷的 CaCl₂ 溶液，吹打混匀，悬浮菌体，放入冰浴 30min。
- 离心 4℃，3000r，8min，弃去上清，加入约 8ml 预冷的 CaCl₂ 溶液，重新悬浮菌体。
- 将用 CaCl₂ 溶液处理后的菌体分装于 1.5ml 的 EP 管中，每管 110ul，保存于 -80℃ 的超低温冰箱中。

感受态细胞测试

随机取 1 支本次制备的感受态细胞，转化一个以前转化成功的质粒，从转化平板上的菌落数及表达鉴定的 SDS-PAGE 电泳图（看是否出现其他的杂带及蛋白表达情况）判断感受态的效价。如果效价好，这批感受态可以用；否则，要重新制备。

注意事项

- 1、每次取感受态细胞时，注意查看库存，保证库存不低于 15 支，少于 15 支时要及时制备。
- 1、菌株生长在对数时进行 CaCl₂ 处理。
- 2、全程操作要【低温无菌】。
- 3、用 CaCl₂ 溶液悬浮菌体时要均匀，不要有块状。
- 4、常用感受态细胞的选择抗性：BL21 (DE3) 无抗性；BL21 Codon plus (DE3) 具有氯霉素抗性；OrigamiB (DE3) 具有卡那霉素抗性，不能用于具有卡那霉素抗性质粒的表达；BL21(DE3)plysS 具有氯霉素抗性；Rosetta (DE3) 具有氯霉素抗性；Shuffle 具有链霉素抗性或不用抗性。

更多优质服务推荐

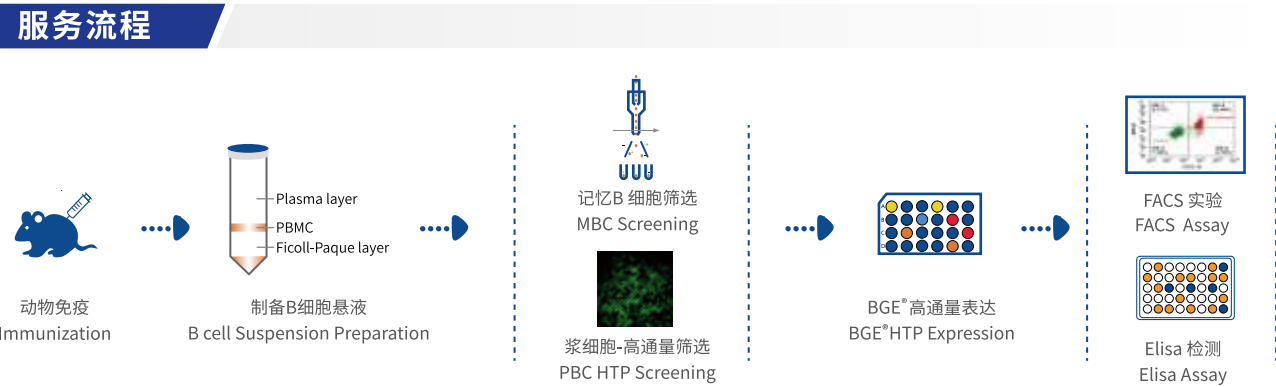
1

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	
 小鼠	 兔
 羊驼	 人源化小鼠
 猪	 犬
 绵羊	 人





Recombinant Antibody Expression Service

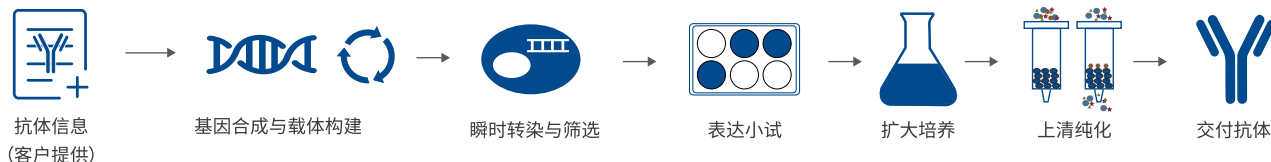
重组抗体表达

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

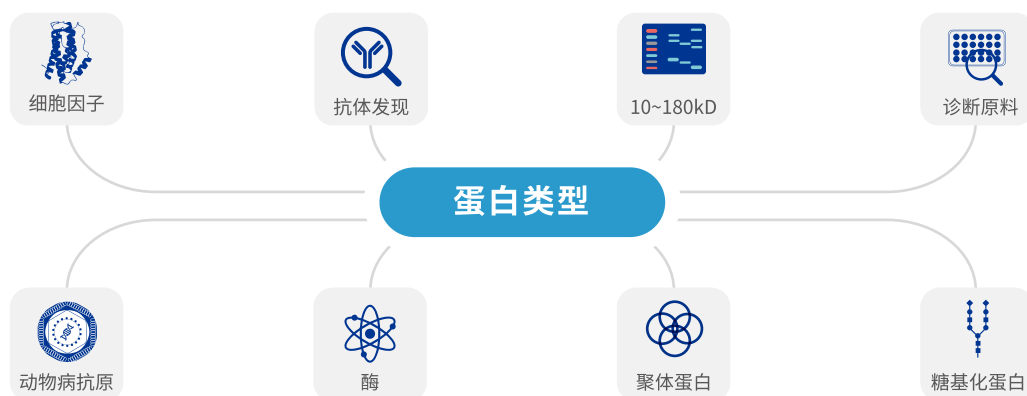


Recombinant Protein Expression Service

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。

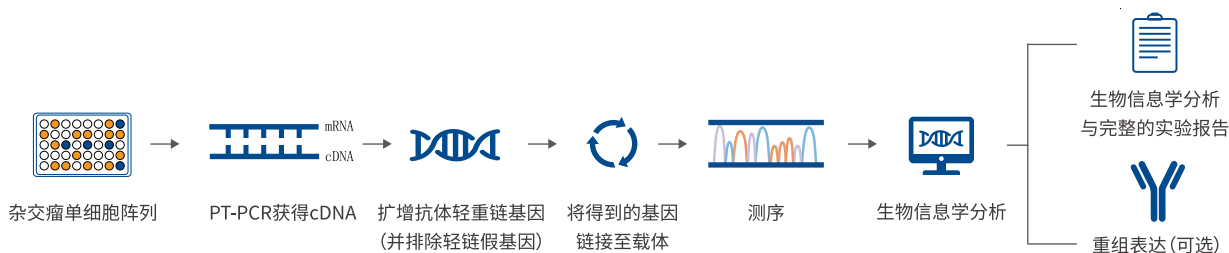
应用场景

- 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

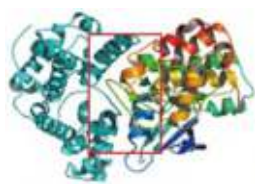


5 Biomolecular Interaction Analysis Service

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



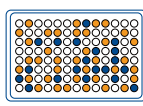
基因合成&质粒抽提



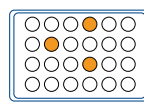
稳定转染



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