

蛋白质浓缩技术介绍及操作简介

简介

蛋白质在制备过程中，由于蛋白分离纯化过程而使得样品变得很稀，澄清后的蛋白质溶液常常需要进行浓缩，以提高蛋白质浓度，减少样品体积，这样有利于随后进一步进行蛋白质色谱纯化。

浓缩技术分类

常用的浓缩方法有吸附法、超滤法、沉淀法、透析干燥法等。每种方法都有自己的优缺点，比如吸附法选择性比较差，不能连续操作，浓缩倍数低；超滤法成本低，操作方便，条件温和，能较好的保持生物大分子活性，回收率高等；沉淀作用对样品中的蛋白质浓度要在 100mg/L 以上，并且由于相变导致收率较低；透析法浓缩需要比较长的时间，体积也受到一定限制；冷冻干燥所需时间长，收率低且在浓缩蛋白的同时也浓缩了盐。

吸附法

吸附法是指通过吸附剂直接吸收除去溶液中水分子使之浓缩。所用的吸附剂必须与溶液不起化学反应，对蛋白不吸附，易于溶液分开。吸附法是最简单快速的浓缩蛋白质溶液的方法，所需仪器简单，适用于稳定性较差的蛋白质。常用的吸附法主要有透析袋浓缩和凝胶浓缩。

超滤法

超滤法是使用一种特殊的薄膜，能够对溶液中各种溶质分子进行选择过滤。液体在一定压力作用下通过膜时，溶剂和小分子透过，大分子受阻保留。该方法最适于生物大分子尤其是蛋白质的浓缩或脱盐。应用超滤法的关键在于膜的选择，水的流速，分子量和截止值等。

沉淀法

沉淀法是早期的蛋白纯化分离方法，但现在只用于蛋白质的初步分离，然后采用色谱法进一步纯化。蛋白质分子在水溶液中离子集团相互作用，通过改变 PH 值或离子强度，加入有机溶剂或多聚物，可以促进蛋白质分子凝聚，形成蛋白质沉淀，再通过离心或过滤可以获得沉淀物，然后利用合适的缓冲液清洗，溶解沉淀物，再经过透析或凝胶过滤，除去残留的溶剂成分。

浓缩操作实验方法

透析袋浓缩

材料：

50%乙醇

10mmol/L EDTA , PH 8.0

0.05mmol/L NaHCO₃

1g/L 叠氮钠

蛋白质溶液

透析袋

透析袋夹

方法：

1. 选择合适 MWCO 的透析袋，剪下需要长度的干透析袋，只能用无粉手套触摸透析袋；
2. 用透析夹关闭透析袋的一端，把蛋白样品加入透析袋中，再关闭另一端，在透析袋里留下一定的空间，并检查每一端样品有无渗漏；
3. 将装好样品的透析袋放入装有透析缓冲液的烧杯中，确信透析袋被完全浸没，然后把烧杯放在磁力搅拌器上搅拌，整个装置放在有适当温度（通常为 4℃，以增加蛋白质稳定性）的环境中；
4. 可以通过测定透析缓冲液缓冲液的电导来检测，当透析液的电导增加慢下来时，就更换缓冲液，直到在经过 1~2h 的搅拌后电导基本保持不变为止，如果没有电导仪，至少再换一次缓冲液，间隔时间为 4~6h，若样品体积较大或透析袋大于 20mm，间隔时间可为 8~12h；
5. 从缓冲液中取出透析袋，用蒸馏水冲洗，除去夹子后将透析过的样品小心倒入容器内；
6. 通过比较透析样品和未用过的透析缓冲液的电导值，证实达到所希望的盐浓度。

如何处理新的透析袋

将减下的新的透析袋浸入蒸馏水中，用手指捏住透析袋将两层分开，先用 50%乙醇彻底冲洗透析袋里外侧（如果是蛋白方面的工作，建议不要煮透析袋，为了更彻底地除去甘油和硫，可以将透析袋浸入到 50%的乙醇中），然后在一个 1L 的烧杯中混合 400mL 10mmol/L EDTA (PH 8.0) 和 400mL 0.05mmol/L NaHCO₃，将透析袋移入烧杯

中，用磁力搅拌器搅拌 30min；用 800mL 水替换溶液，搅拌 10min，重复一次，将透析袋移入新蒸馏水中。透析袋用完之后，4°C 保存于含 0.1% 叠氮化钠的水中，任何时候都不要让透析袋变干。

超滤浓缩

浓缩样品

1. 要浓缩的样品含盐量必须 0.3M 以上，含盐量低的样品须补加到 0.3M NaCl；
2. 在内管（附有 3KD 膜）中加入 500 μ l 样品，将内管套入外管；
3. 对称放置离心管，14520rpm（即 14000g）离心。（离心 5min 约浓缩 2 倍，10min 约 4 倍，15min 约 6 倍，20min 约 8 倍，30min 约 10 倍）；
4. 离心结束后，将内管倒置套在另一个干净的离心管呢，3880rpm 离心 min 收集浓缩后的样品。或者用移液器直接吸出内管中的样品。

浓缩管使用后的处理和保存

1. 使用完的浓缩管，立即加入 500 μ l 含 1M NaCl 的缓冲液（此缓冲液与浓缩样品的缓冲液一致），8000rpm 离心 20min；
2. 甩净内管中的盐溶液，将内管放入超纯水中浸泡 1h；
3. 内管加入超纯水 500 μ l，8000rpm 离心 5min；
4. 甩净内管中的水，加入 500 μ l 0.2M NaOH，8000rpm 离心 20min；
5. 甩净内管中的 NaOH 溶液，用超纯水再 8000rpm 离心 5min；
6. 甩净内管中的水，放入含 0.2-0.5‰ NaN₃ 的生理盐水中；
7. 外管用自来水洗净后，用超纯水冲洗干净，晾干。

更多优质服务推荐

1

SingleB® mAb Discovery Service

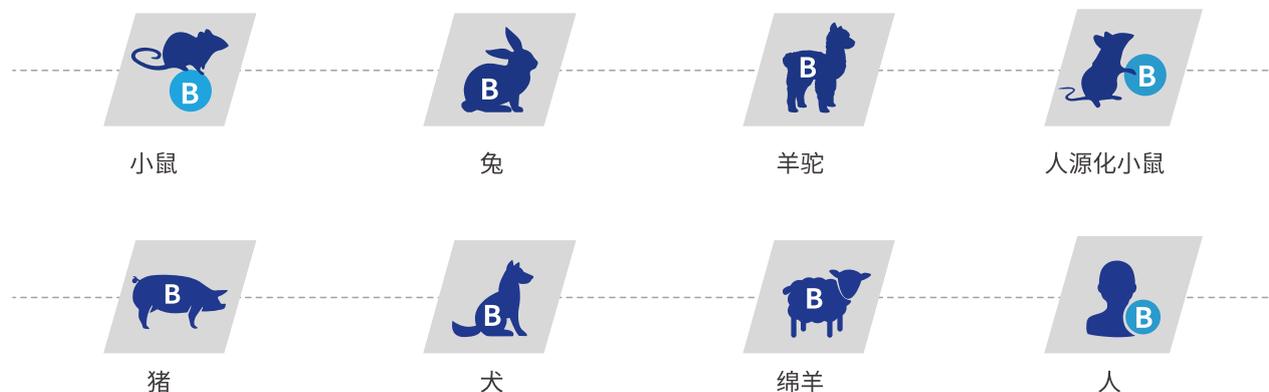
SingleB®单B细胞快速单抗发现

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。

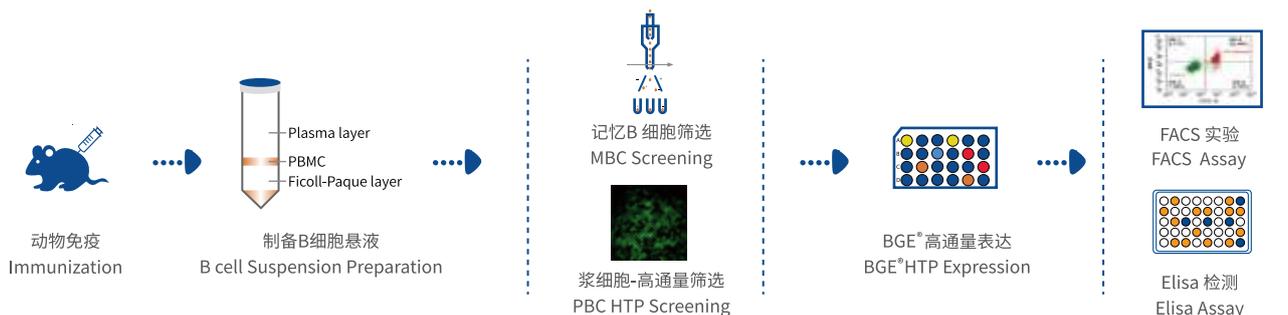
平台优势

- 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

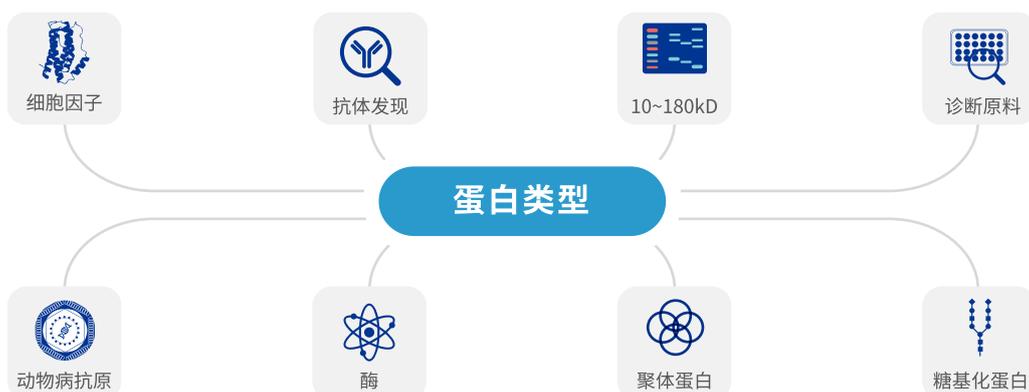


Recombinant Protein Expression Service

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。

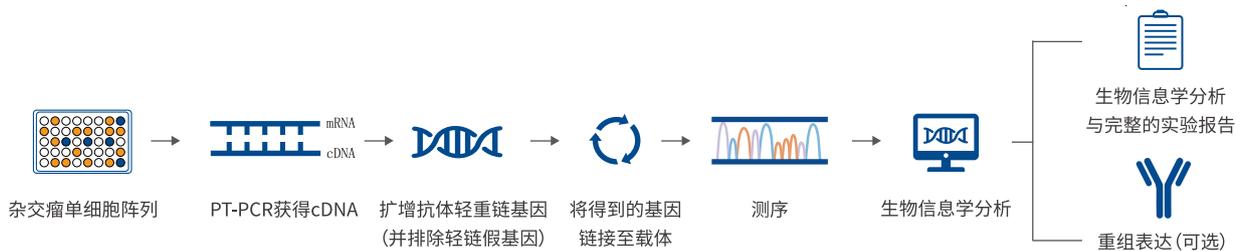
应用场景

- 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



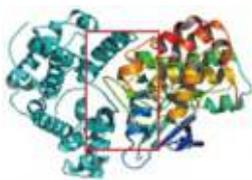
5

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。

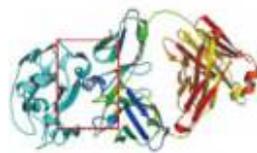
检测范围



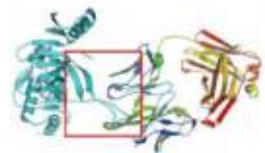
蛋白和蛋白



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



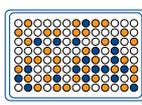
基因合成&质粒抽提



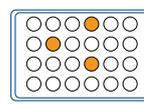
稳定转染



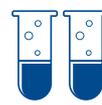
On-chip筛选



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