

欢迎参加默克密理博生物技术交流会

感谢广州东锐科技公司的大力支持！

400-889-1988-2 欢迎垂询

今天的探讨内容

上午

- 重组蛋白表达与制备技术
- 膜的魔术——**Millipore**实验室常用耗材产品简介

下午

- 液相芯片**Milliplex**与**Elispot**在新药、细胞治疗和疫苗研发中的应用
- 细胞凋亡、增殖、活力的经典及创新检测技术介绍

默克集团公司简介

世界上历史最悠久的医药化工企业，其历史可追溯到**1668**年，总部位于德国达姆斯达特在**64**个国家拥有分支机构，员工近**40000**人
2010年收购 Millipore- **Merck Millipore**
2011年收购清大天一



默克密理博

生命科学部
生物制药工艺部
实验室纯水部
实验室基础部



2014年9月22日宣布收购**Sigma**
加强在生命科学领域的领先地位

SIGMA-ALDRICH®

默克密理博生命科学 旗下品牌...



UpState 历史悠久 精益求精
表观遗传及信号通路研究领跑者



Chemicon 权威品质 成就发现
干细胞和神经研究金标准



专注代谢类疾病及细
胞因子检测



细胞凋亡



新流式，新思维

默克密理博 旗下品牌...



Calbiochem 小分子 大智慧
信号通路抑制剂行家之选
稳定 放心 创新



- 原核表达 (PET)
- 昆虫/哺乳动物细胞表达
- 蛋白抽提和纯化



MILLIPORE

- 以膜为核心技术的产品
- 微滤/超滤
- 印迹/高通量检测
- 细胞培养

Merck Millipore is a division of



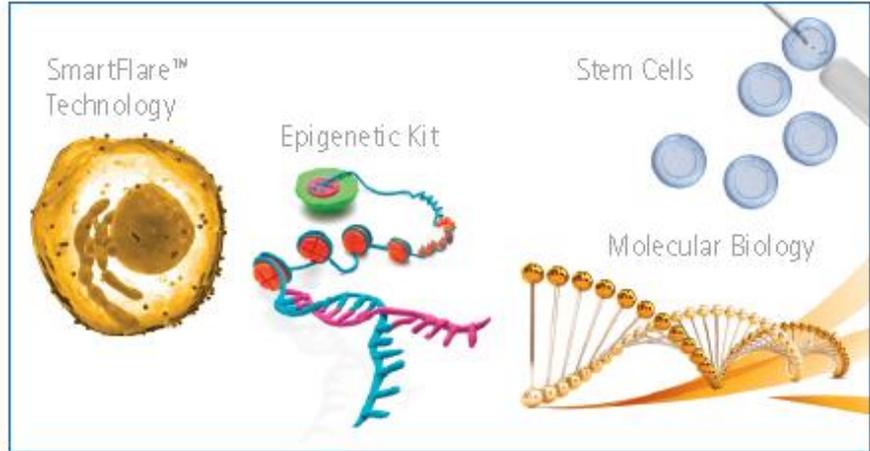
默克密理博生命科学部——您研究工作伙伴



干细胞、神经生物学、信号通路研究产品



流式细胞系列分析仪器



细胞培养与检测



核酸/蛋白纯化/浓缩与换液

WB检测等蛋白免疫分析



抗体药 ● 疫苗 ● 体外诊断



默克密理博生命科学部
生物制药上游研发实验室
常用产品概要
抗体药 ● 疫苗 ● 体外诊断

- 生物标志物(Biomarker)研究
- 高效蛋白表达系统
- 活性蛋白温和抽提、纯化
- 抗体纯化、标记
- 过滤与超滤：100uL-20L
- 高通量样品制备与分析
- 细胞培养与功能研究
- 优质大包装生化试剂



Merck Millipore is a division of MERCK

- 生物标志物(Biomarker)研究
- 高效蛋白表达系统
- 活性蛋白温和抽提、纯化
- 抗体纯化、标记
- 过滤与超滤：100uL-20L
- 高通量样品制备与分析
- 细胞培养与功能研究
- 优质大包装生化试剂

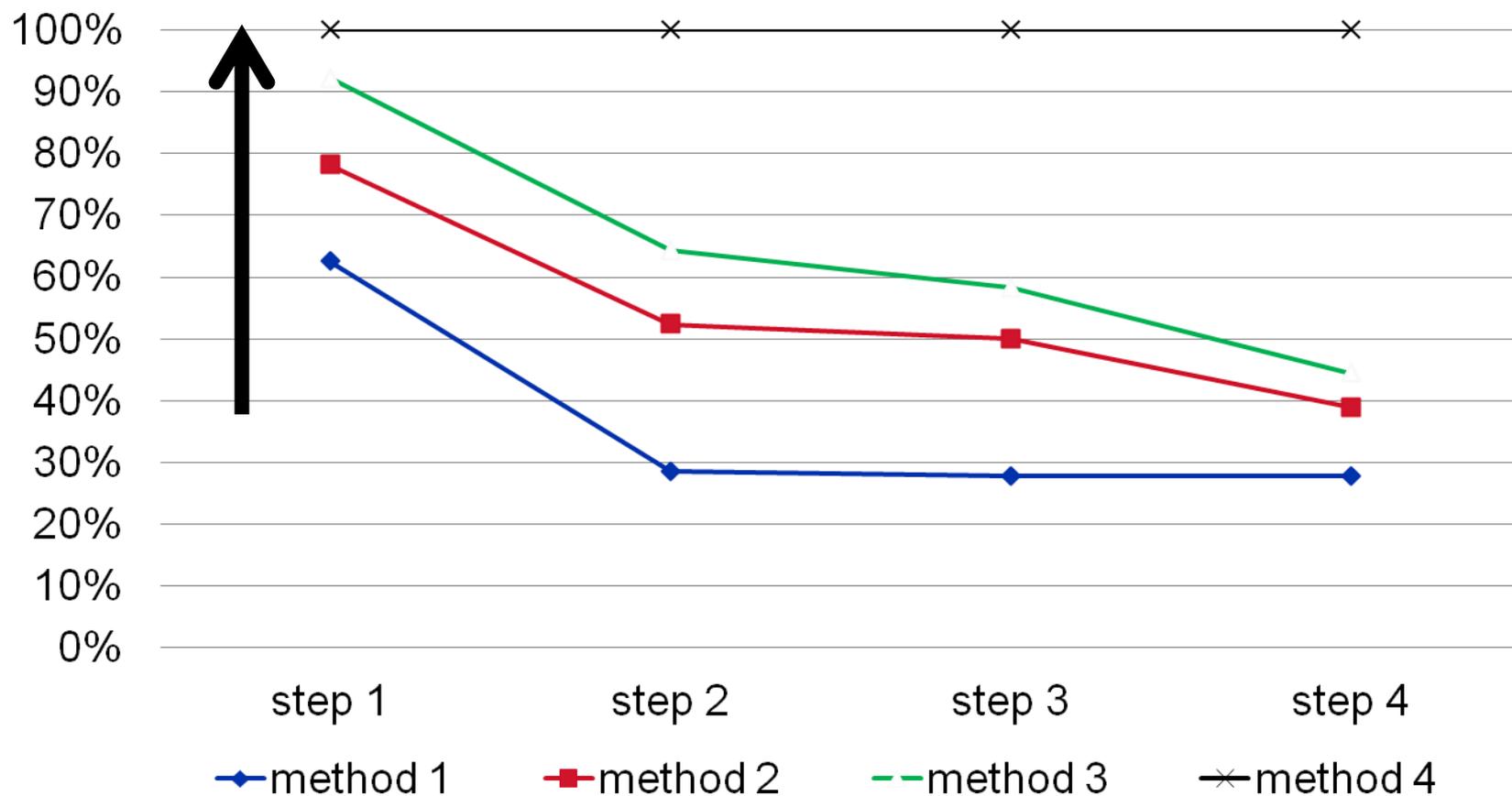
提高活性蛋白表达水平，事半功倍

——默克密理博Novagen重组表达平台介绍与经验分享

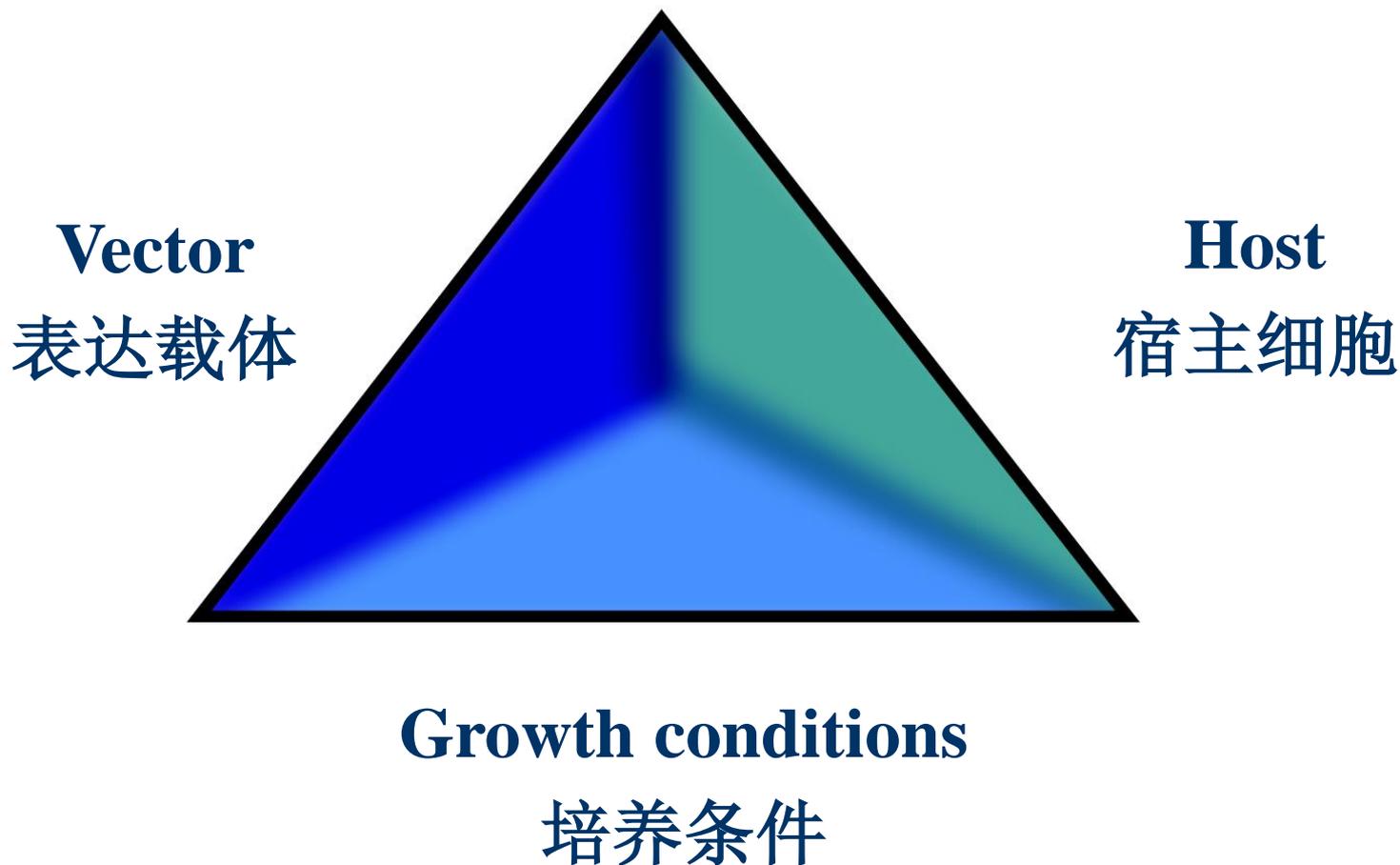
何煜 allen.he@merckgroup.com

如果能大幅提高蛋白产量.....

不同方法抽提、纯化蛋白的得率

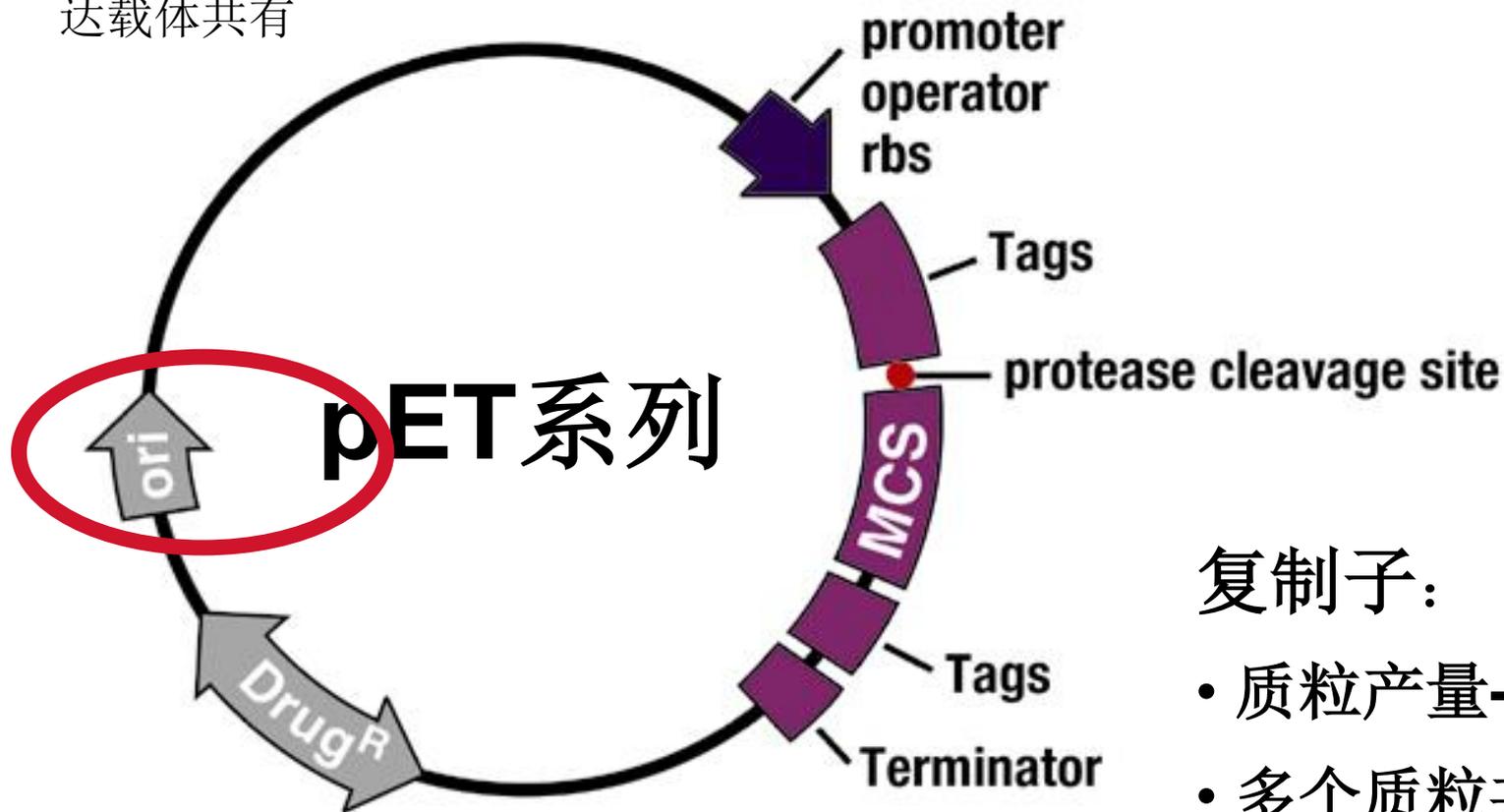


重要原则：选择合适的表达平台（宿主）



重要原则：选择合适的载体

克隆载体和表
达载体共有

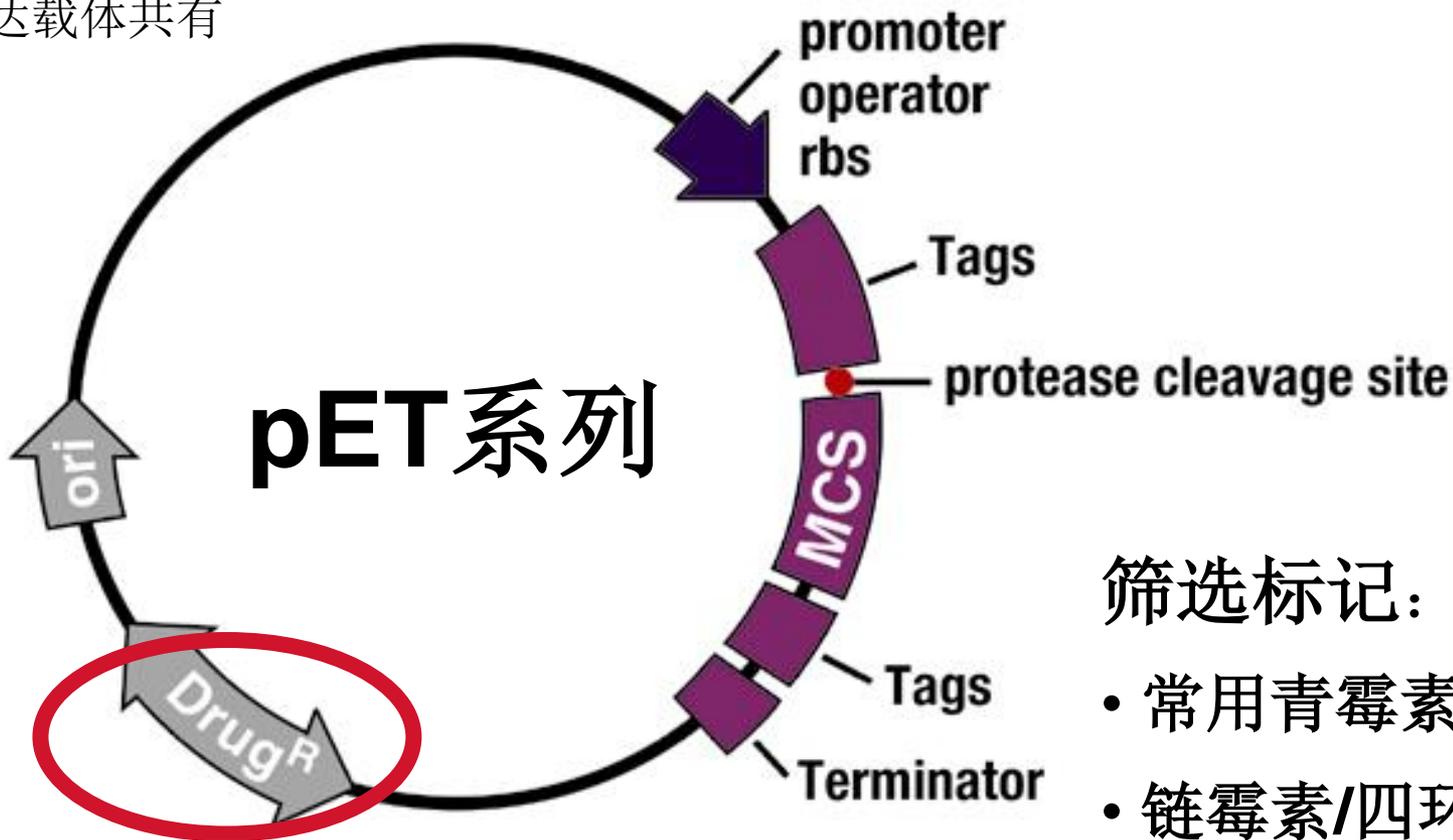


复制子:

- 质粒产量-蛋白产量
- 多个质粒共表达

重要原则：选择合适的载体

克隆载体和表
达载体共有



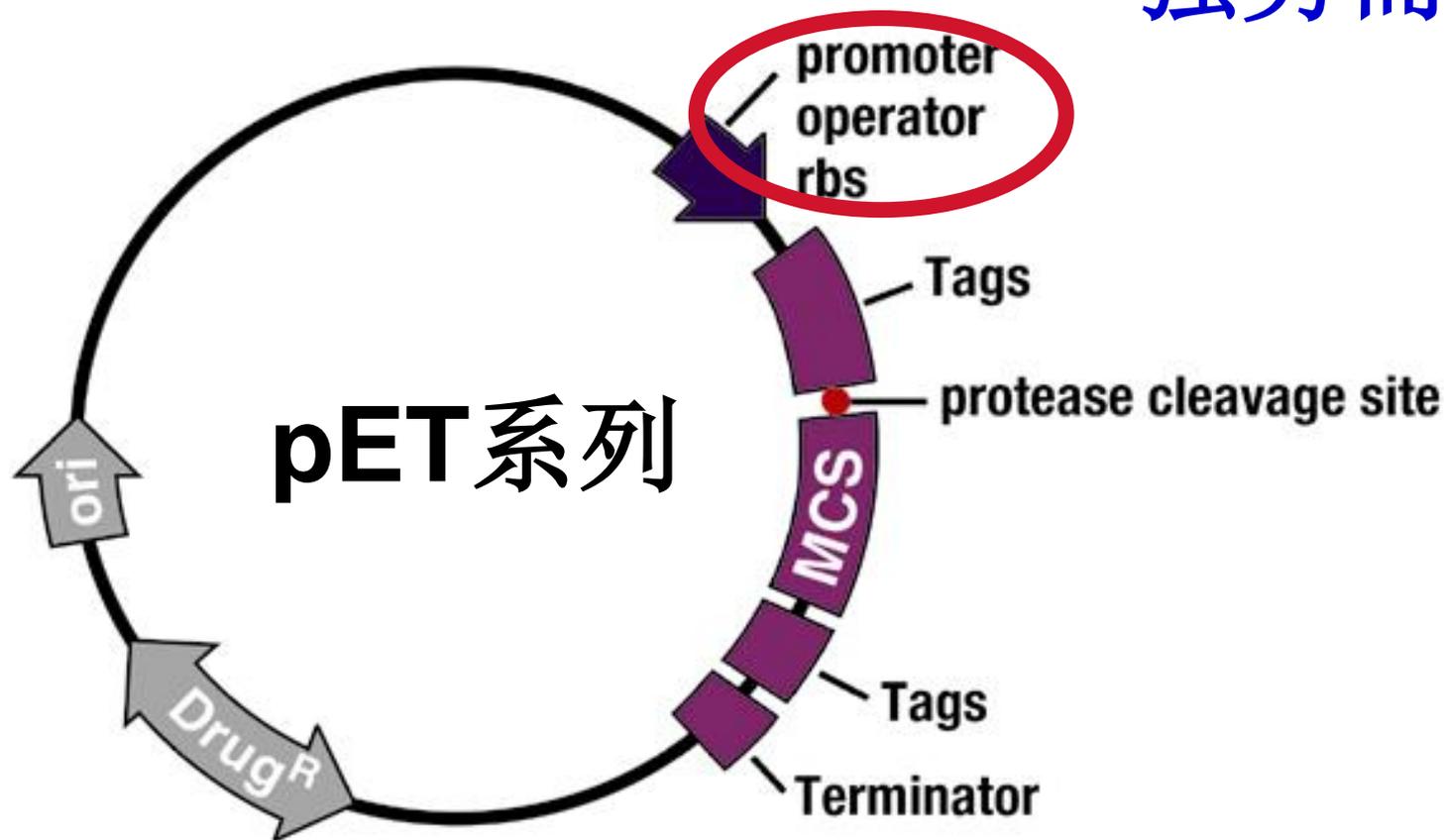
筛选标记:

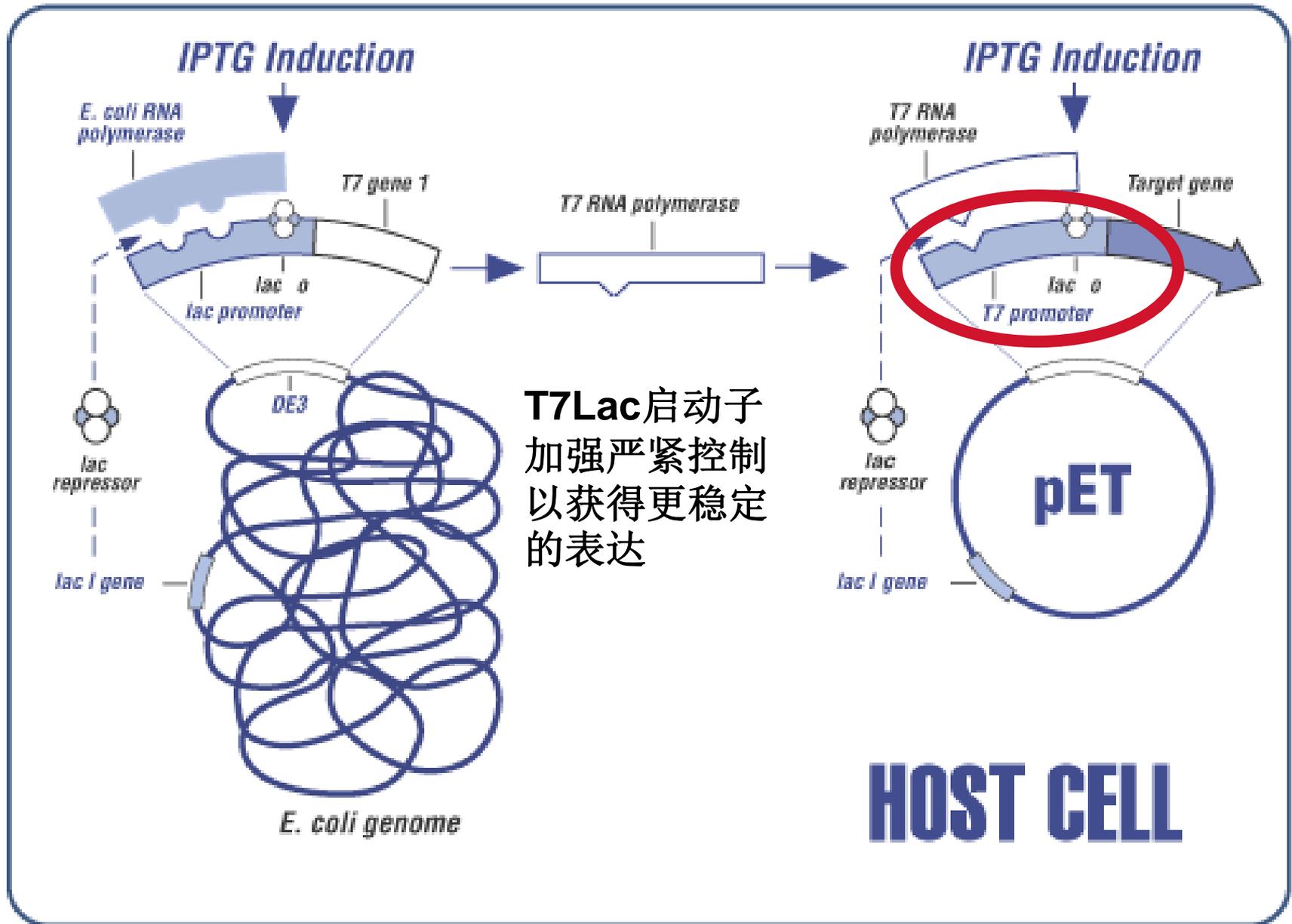
- 常用青霉素/卡那霉素
- 链霉素/四环素等

重要原则：选择合适的载体

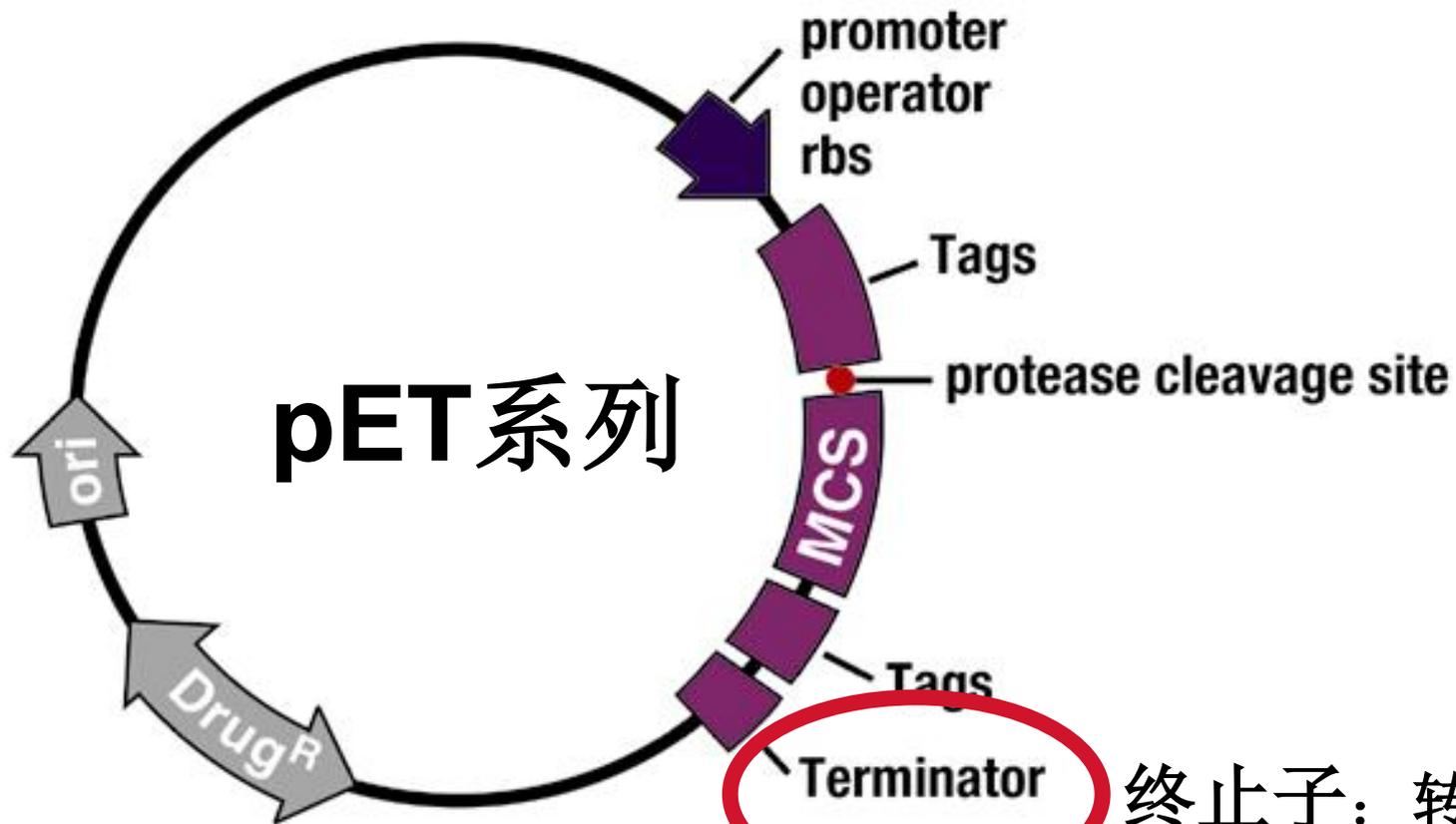
启动子：带有T7 Lac启动子的pET系列表达载体成为金标

强势而可控



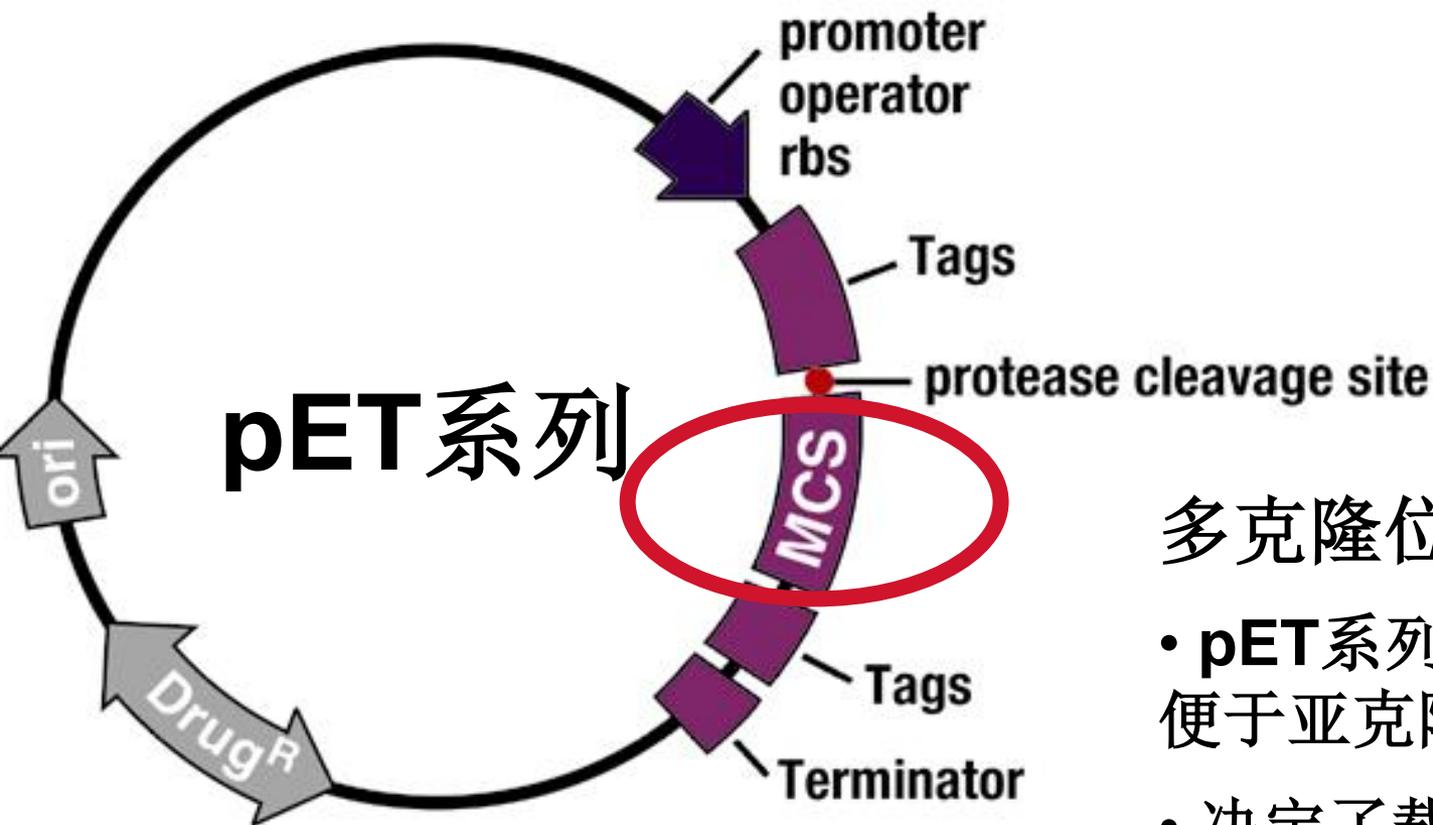


重要原则：选择合适的载体



终止子：转录水平的终止，也可考虑翻译水平的终止

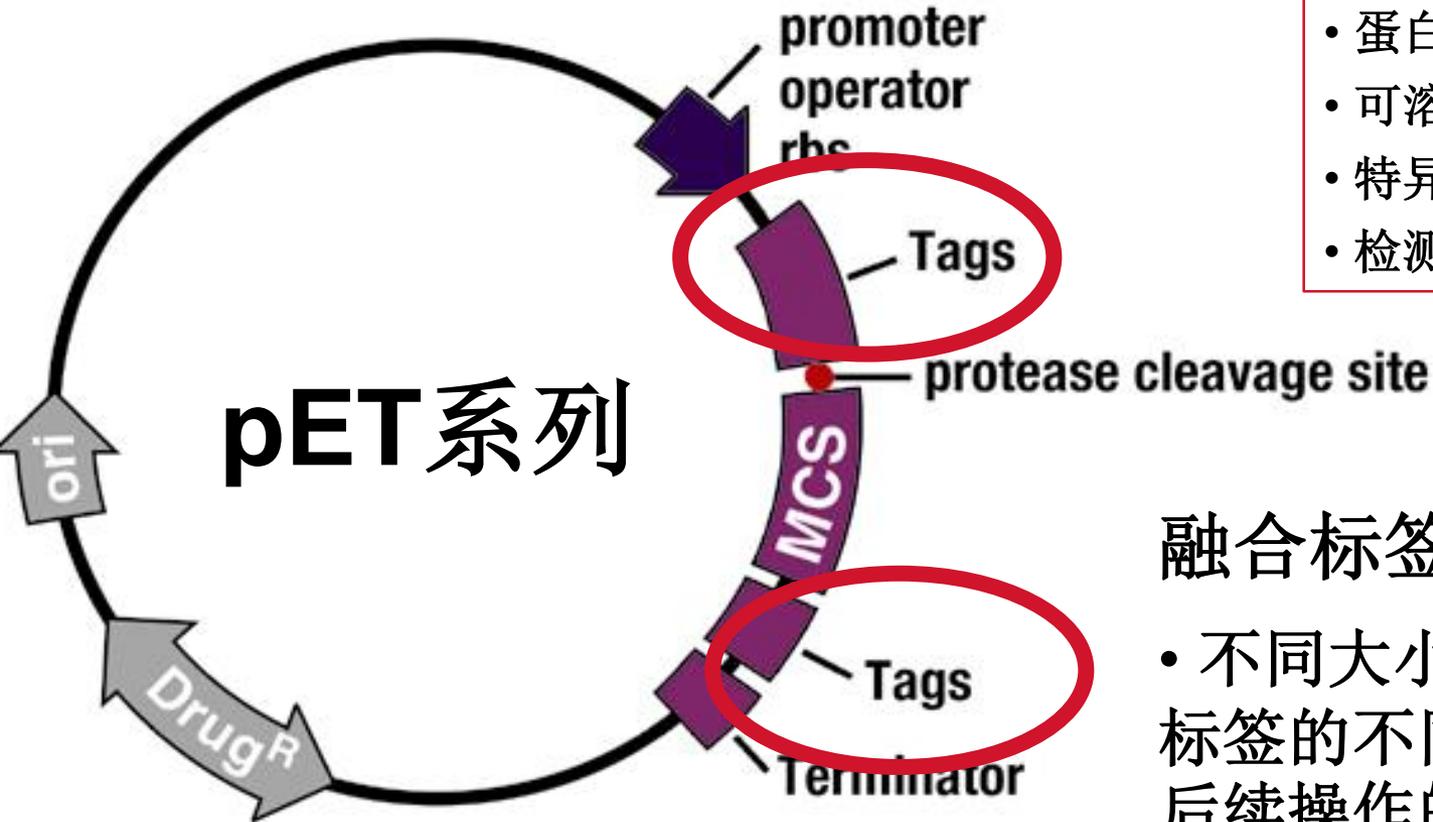
重要原则：选择合适的载体



多克隆位点:

- pET系列共同的设计便于亚克隆
- 决定了载体来源序列在蛋白产物上的位置和应用

重要原则：选择合适的载体

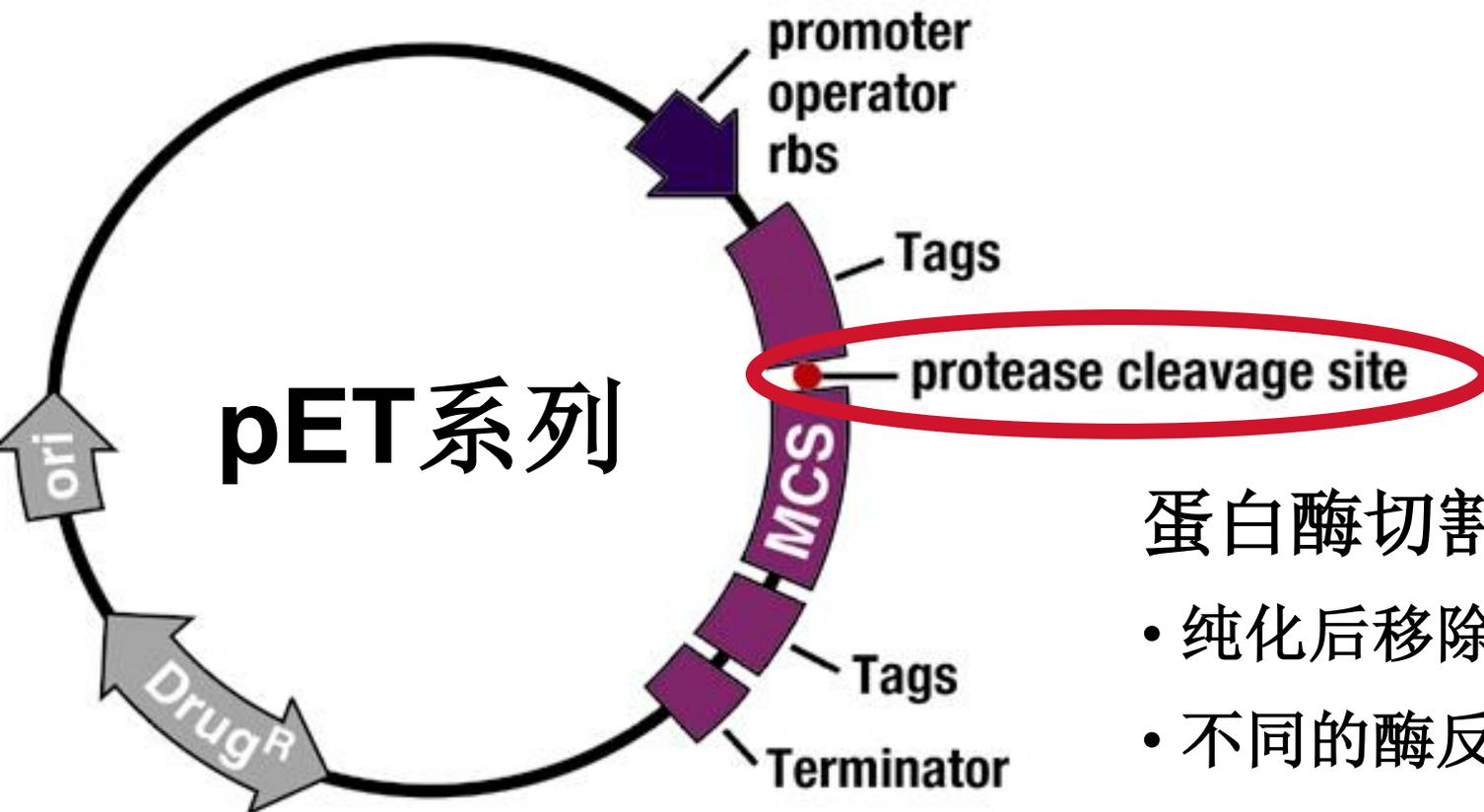


- 提高产量和稳定性
- 蛋白定位与分泌
- 可溶性
- 特异性亲和纯化
- 检测**

融合标签：

- 不同大小的**C-或N-端**标签的不同功能与对后续操作的影响
- 是否需要或容忍标签的存在

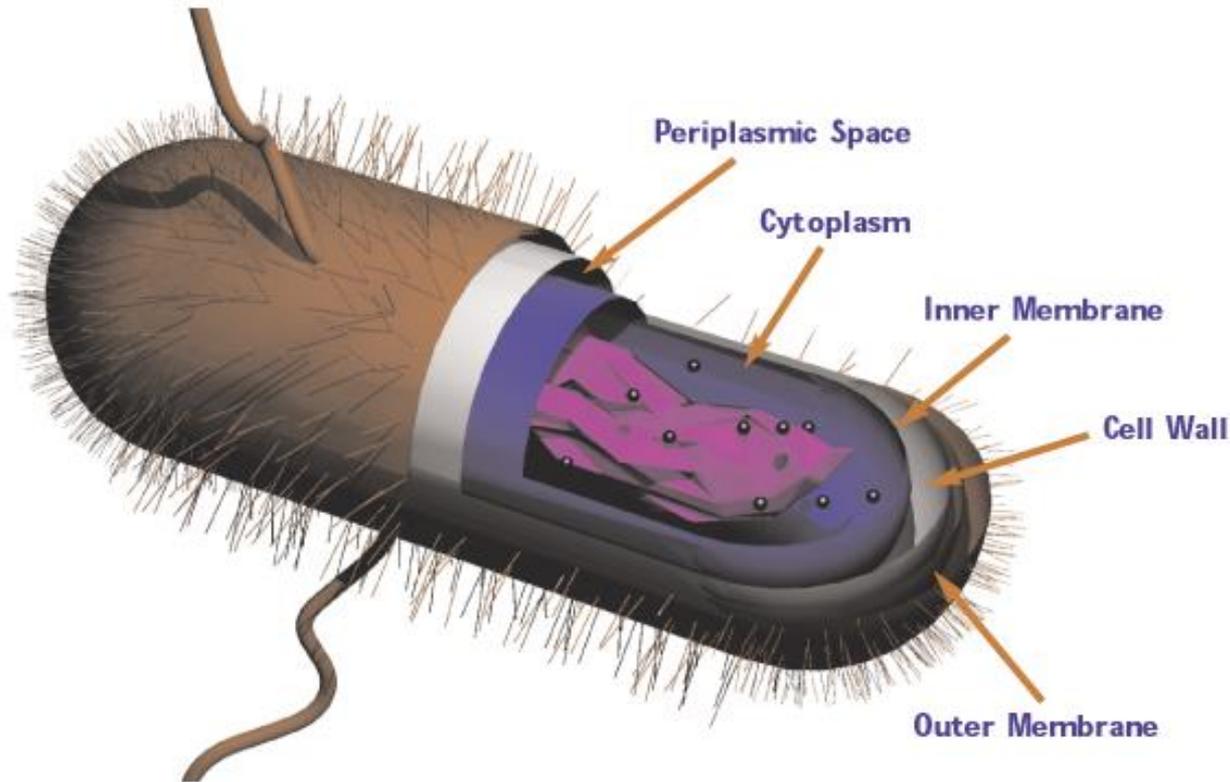
重要原则：选择合适的载体



蛋白酶切割序列：

- 纯化后移除外源序列
- 不同的酶反应条件不同

增加蛋白活性/可溶性的策略：载体



融合标签

分泌信号

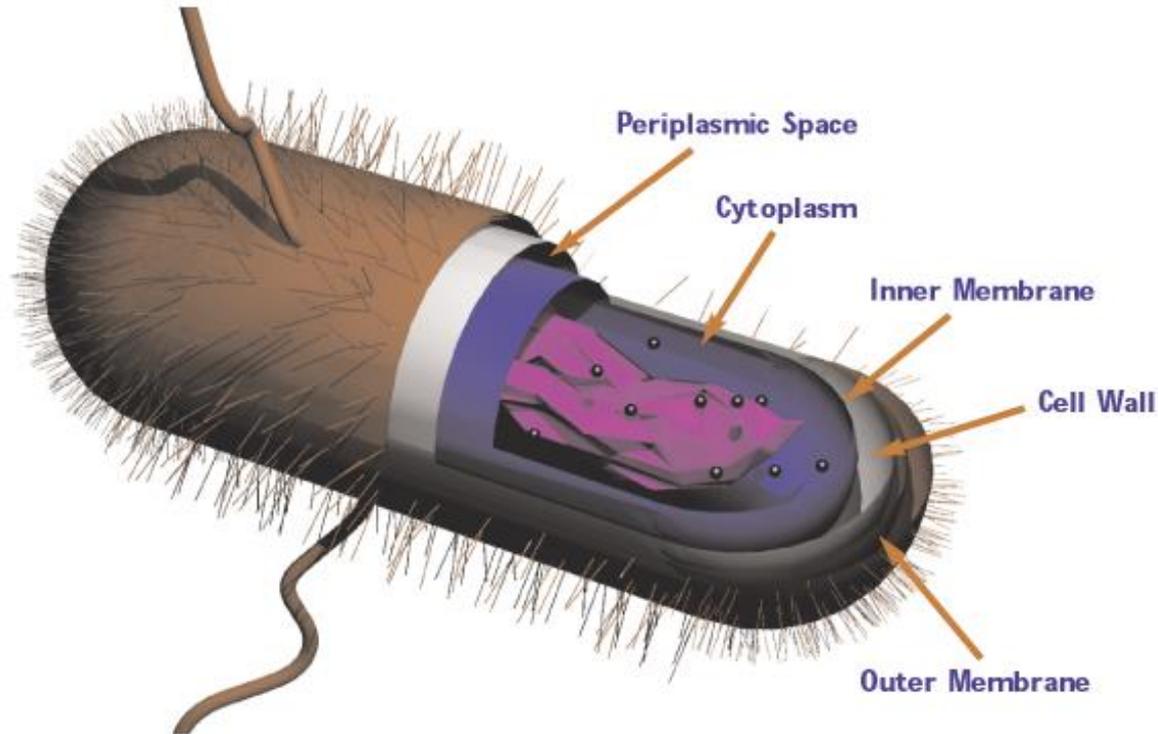
- *pelB* leader (22 aa)
- *ompT* leader (20 aa)

增加蛋白活性/可溶性的策略：载体

融合标签

融合表达的氧化酶

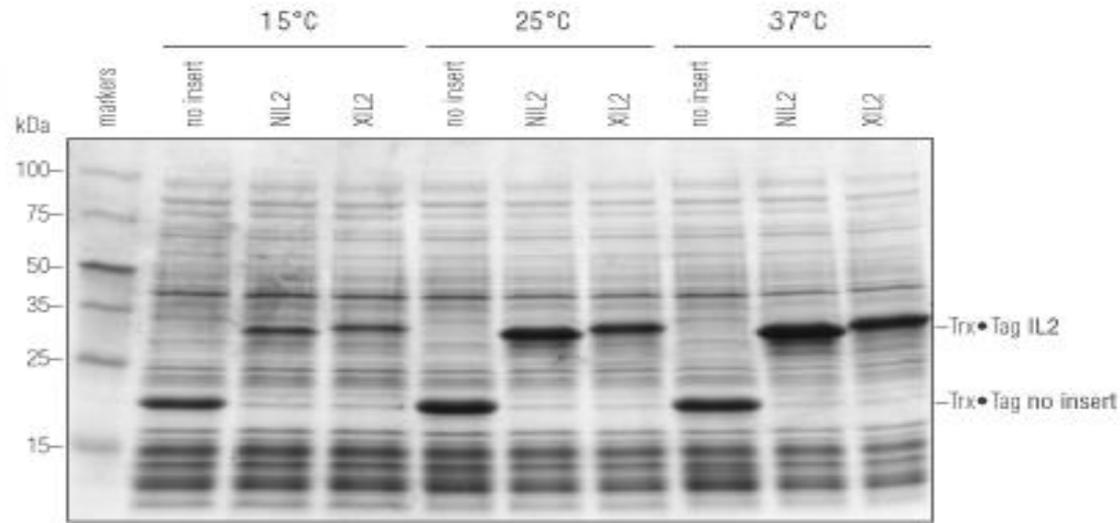
- 氧化还原酶 (208 aa, *DsbA*的基因产物)
- 二硫键异构酶 (236 aa, *DsbC*的基因产物)
- 硫氧还蛋白 (109 aa, *trx*)



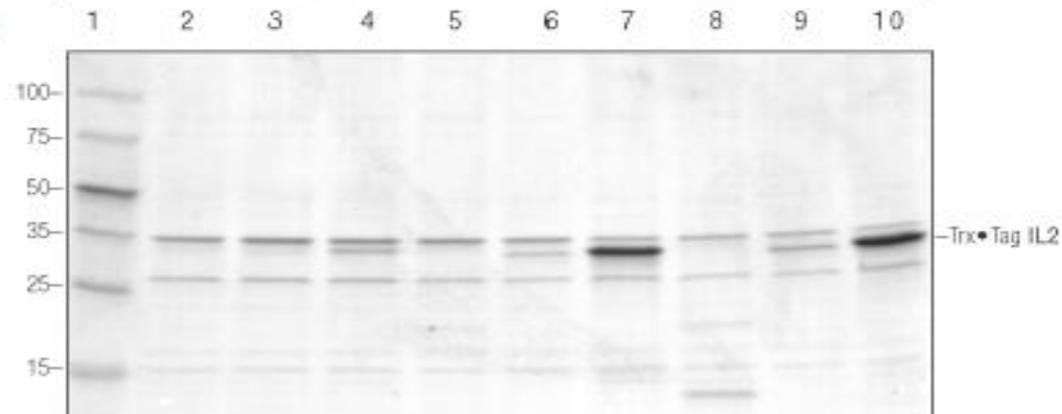
经典案例：IL-2的工业化生产

Analysis of pET-32a(+) IL-2 Clones Induced at 15°, 25° and 37°

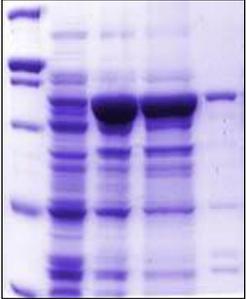
A. Soluble fraction



B. Insoluble fraction



University of Oklahoma
School of Chemical Engineering and Materials Science
Recombinant Protein Solubility Prediction

A screenshot of a web interface for protein solubility prediction. It features a large text input field for entering a protein sequence. To the right of the input field are two buttons: "Submit Query" and "Reset". There are also small navigation icons (back, forward) at the bottom left of the input field.

Type (or cut and paste) your protein sequence below, click on the "Submit" button, and the solubility probability of your protein will be calculated. The statistical model predicts protein solubility **assuming the protein is being overexpressed in *Escherichia coli***. If there are numbers, spaces, or other characters in your sequence, don't worry, they won't affect the calculation. For more information on the solubility model used here, see the [references](#) below.

References:

- R.G. Harrison.** 2000. Expression of soluble heterologous proteins via fusion with NusA protein. *inNovations*. **11**:4-7. [PDF file](#)
- Davis, G.D., Elisee, C., Newham, D.M. and R.G. Harrison.** 1999. New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **65(4)**:382-8. [PubMed Abstract](#)
- Wilkinson, D.L. and R.G. Harrison.** 1991. Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Bio/Technology*. **9**: 443-448. [PubMed Abstract](#)

增加蛋白活性/可溶性的策略：载体

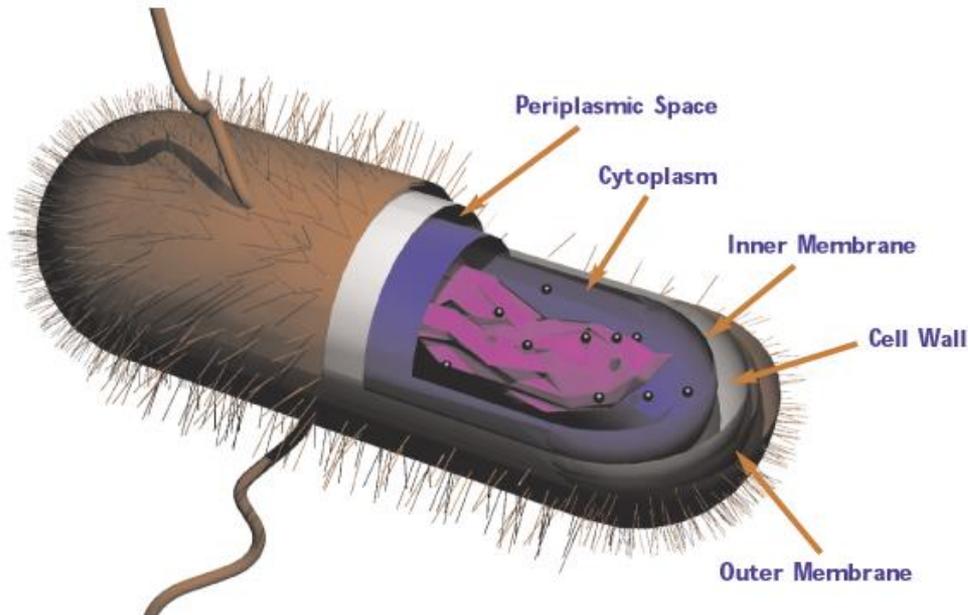
融合标签

分泌信号

- *pelB* leader (22 aa)
- *ompT* leader (20 aa)

融合表达的氧化酶

- 氧化还原酶 (208 aa, *DsbA*的基因产物)
- 二硫键异构酶 (236 aa, *DsbC*的基因产物)
- 硫氧还蛋白 (109 aa, *trx*)

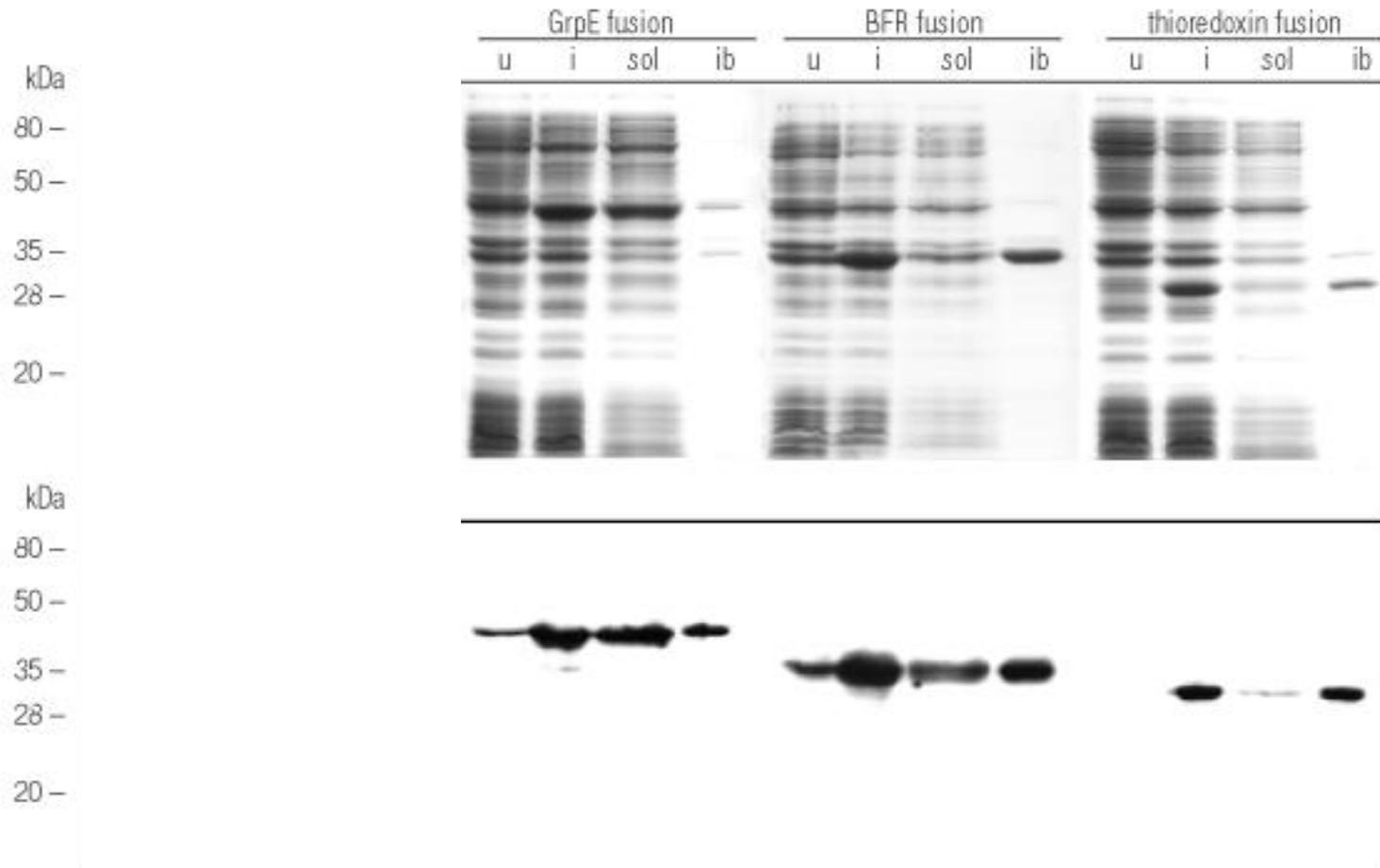


高可溶性蛋白

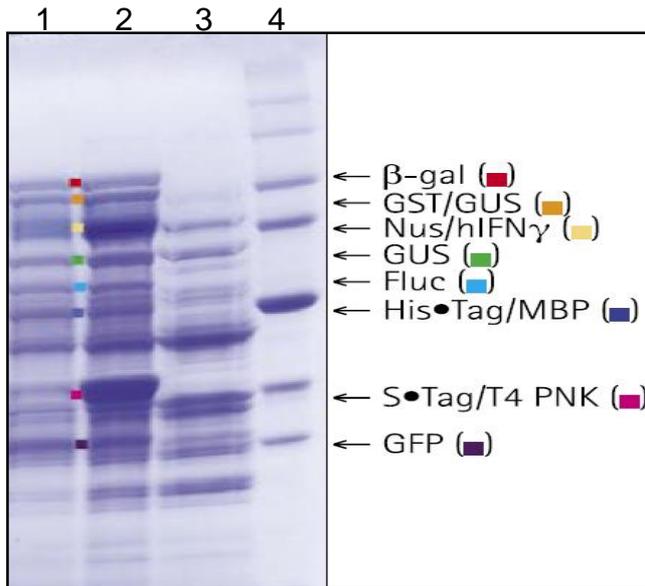
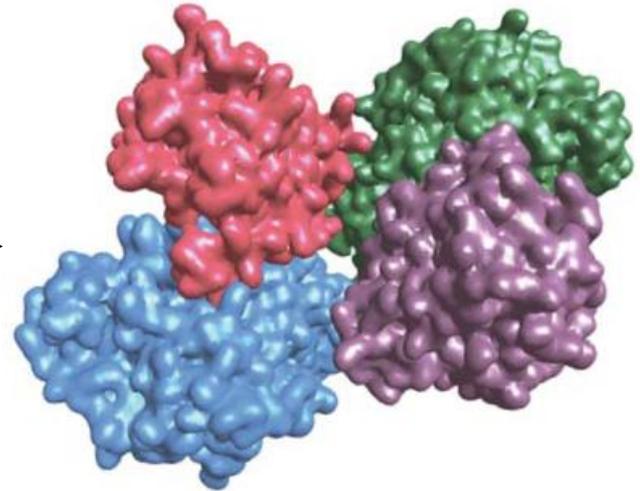
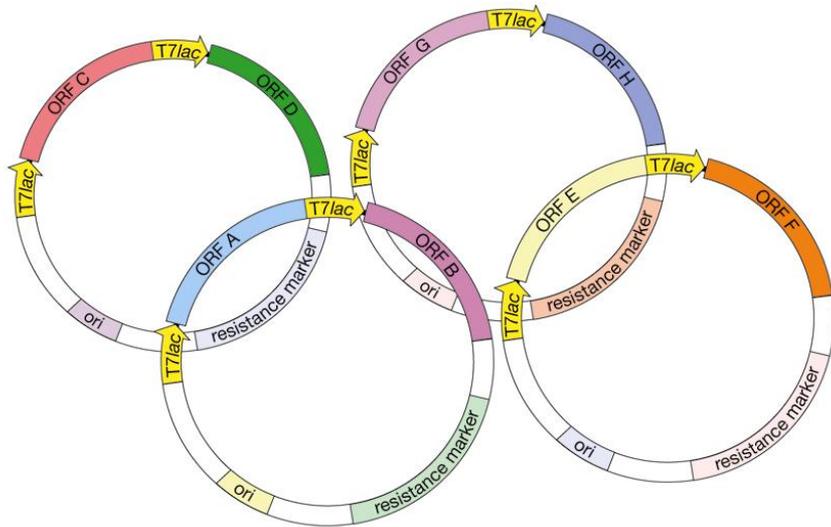
- 谷胱甘肽还原酶 **GST** (220 aa)
- **NusA** (495 aa)

经典案例：IL-3可溶性改善

N-utilization Substance Fusions



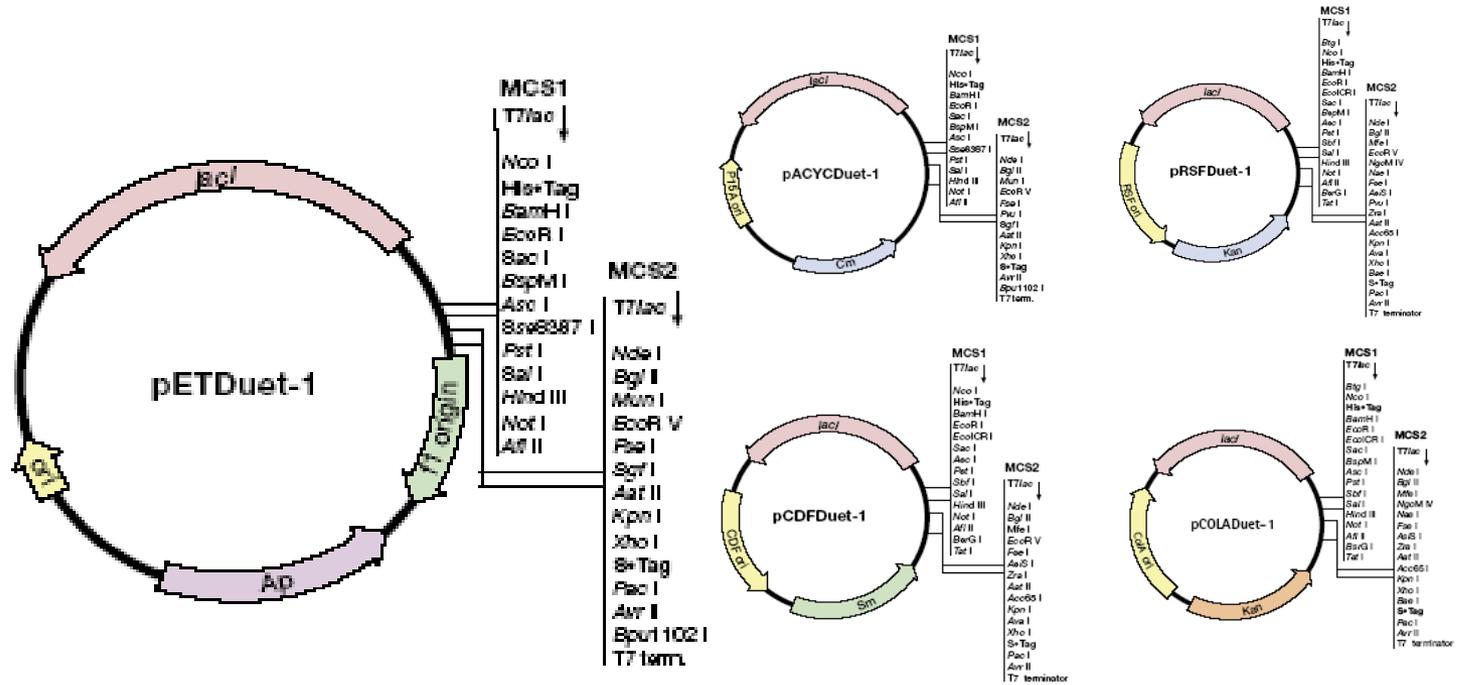
在一个表达系统中实现1-8个蛋白共同表达



Lanes:

- 1 pRSFDuet-1, pACYCDuet-1, pETDuet-1, pCDFDuet-1 combination
- 2 pCOLADuet-1, pACYCDuet-1, pETDuet-1, pCDFDuet-1 combination
- 3 Uninduced control
- 4 Perfect Protein™ Markers

多亚基蛋白表达、目的蛋白-辅因子共表达 变得灵活、简便可控



Plasmid	Replicon (source)	Copy Number	Resistance
pETDuet-1	ColE1 (pBR322)	~40*	Ampicillin (carbenicillin)
pACYCDuet-1	P15A (pACYC184)	10-12*	Chloramphenicol
pCDFDuet-1	CloDF13	~20-40*	Streptomycin, spectinomycin
pRSFDuet-1	RSF1030	> 100*	Kanamycin
pCOLADuet-1	ColA	~20-40	Kanamycin

* Copy number estimates are based on agarose gel analysis (3).

pET系列载体：满足各种表达要求

- **Strep•Tag[®] II**: pET-51,-52; 提高纯度, >95%
- **HRV 3C**: pET-47,-48,-49,-50; 低温切割保护蛋白
- **NusA**: pET-43.1, -44, -50b; 提高可溶性
- **GST**: pET-41,-42; 提高可溶性, 纯化, 活性检测
- **Trx**: pET-32; 提高可溶性
- **site-specific ³²P-labeling**: pET-33; 目的蛋白标记
- **Peptide Expression**: pET-31, 小肽表达
- **pET-28, 29, 30**: 常用带HisTag的载体
- **Duet Coexpression Vectors**: 双阅读框载体, 蛋白复合物表达
- **LIC**: 提高克隆效率的载体设计

稳定高产表达

提高蛋白可溶性与活性

多基因共表达

提供纯化便利

不带外源序列的蛋白产物

宿主细胞

Protein Expression Strains

General protein expression

BL21
BL21(DE3)

Certified animal-free

Veggie™ BL21(DE3)
Veggie BL21(DE3)pLysS

Insoluble protein/ No activity

Reason: Reduction of disulfide bonds resulting in misfolded protein

Origami™ 2
Origami 2(DE3)
Rosetta-gami™ 2
Rosetta-gami 2(DE3)
Rosetta-gami B
Rosetta-gami B(DE3)

Solution:
Minimize protein reduction in cytoplasm; use *trxB/gor* hosts

Reason: High levels of expression resulting in misfolded protein

Tuner™
Tuner(DE3)
Rosetta-gami B
Rosetta-gami B(DE3)

Solution:
Attenuate expression/titrate IPTG; use *LacY⁻* hosts

Truncated protein

Reason: *E. coli* codon bias

Rosetta™
Rosetta(DE3)
Rosetta 2
Rosetta 2(DE3)
Rosetta-gami™ 2
Rosetta-gami 2(DE3)
Rosetta-gami B
Rosetta-gami B(DE3)
RosettaBlue™
RosettaBlue(DE3)

Solution:
Use a host that supplies rare tRNAs

Stabilizing target plasmids

Reason: Target plasmid unstable do to repetitive sequences

BLR(DE3)
HMS174
HMS174(DE3)
NovaBlue
NovaBlue(DE3)

Solution:
Use *recA⁻* hosts

Toxic protein

Symptom: No protein/cell death

Tuner™
Tuner(DE3)
NovaBlue
NovaBlue(DE3)
Any pLysS host

Solution:
Supress basal expression; use a stringent control host

Protein labeling

B834
B834(DE3)

Use a methionine auxotroph host for higher specific activity

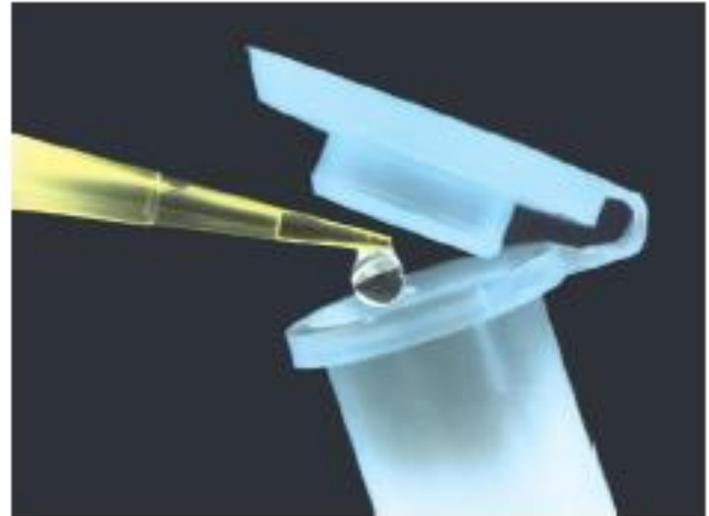
重要原则：宿主菌的种类与品质

区别：

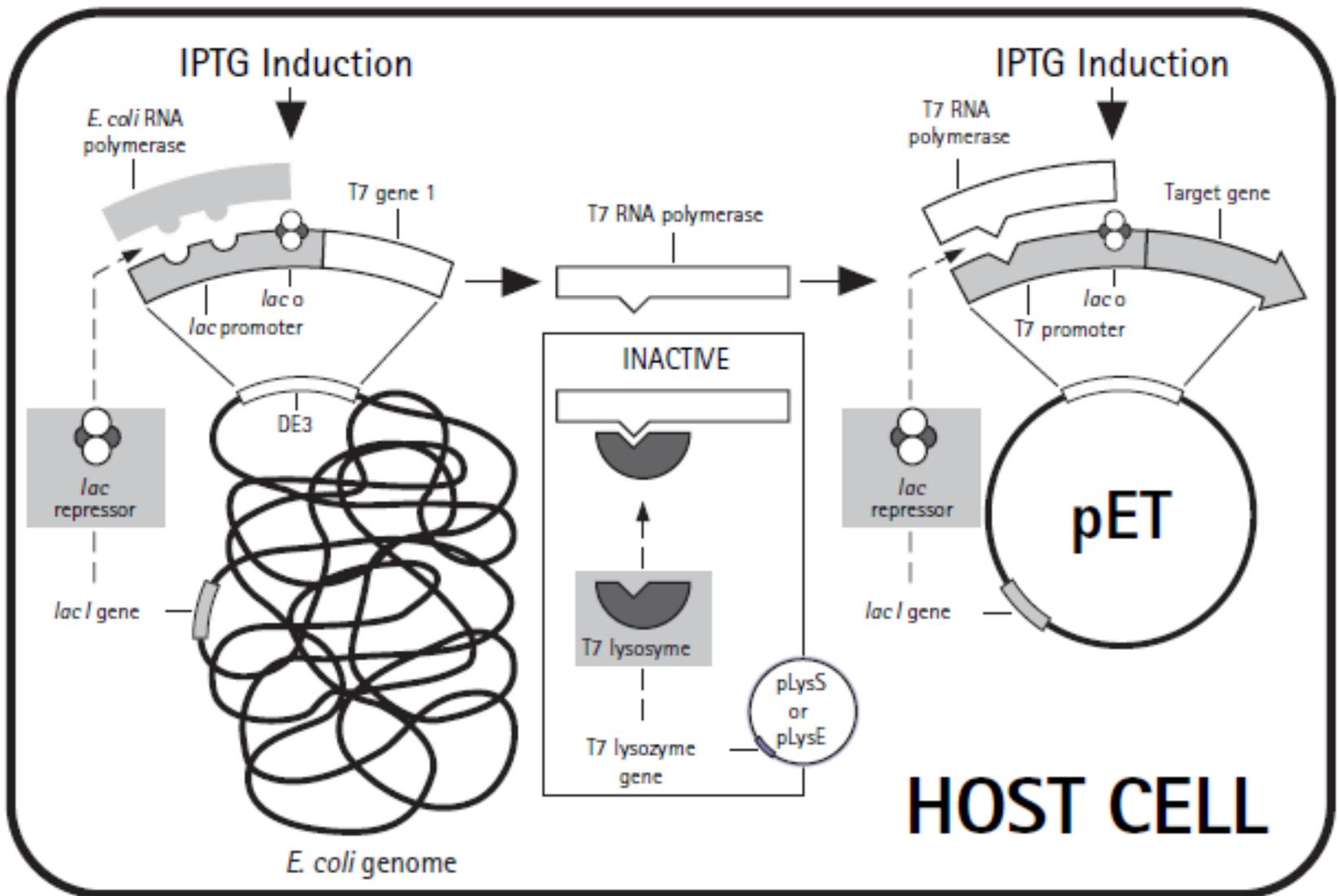
BL21

BL21 (DE3)

BL21 (DE3) *pLySs*

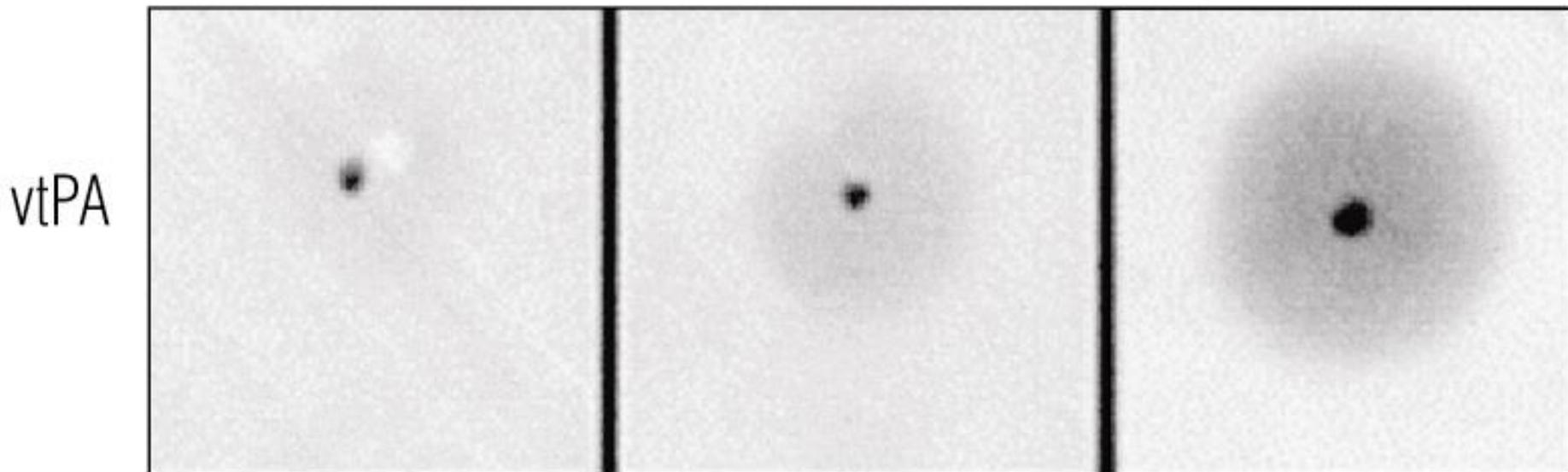


pLysS系列：提高毒性蛋白表达产量与稳定性



增加蛋白活性/可溶性的策略: Origami

二硫键的正确形成与折叠



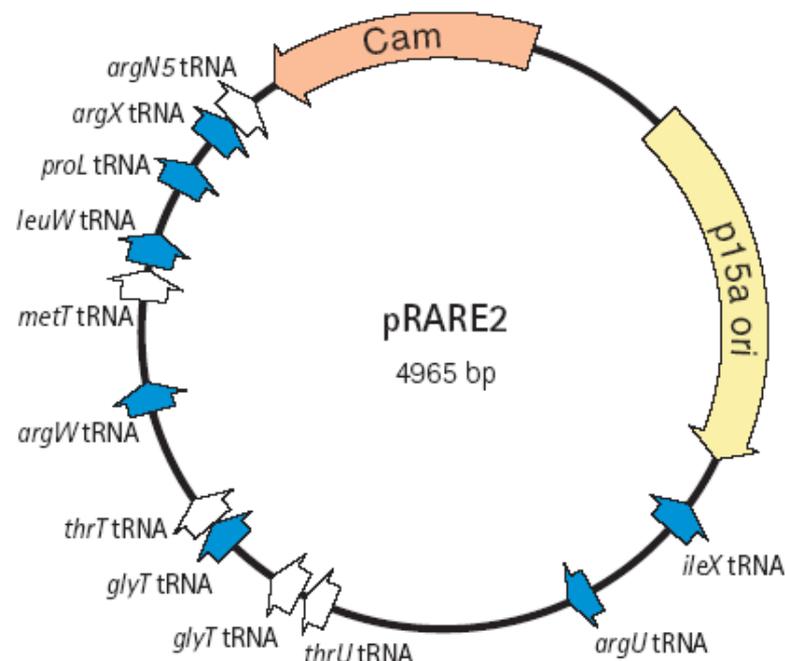
Tissue plasminogen activator (9 disulfide bonds) was expressed in three different hosts. 10 μg of soluble protein was spotted onto fibrin agarose plates and incubated for 24 h at 37° C. Zone of clearing measures biological activity of tPA.

获得全长蛋白，提高产量：Rosetta

Table 1. Arg, Gly, Ile, Leu and Pro codon usage in *E. coli*

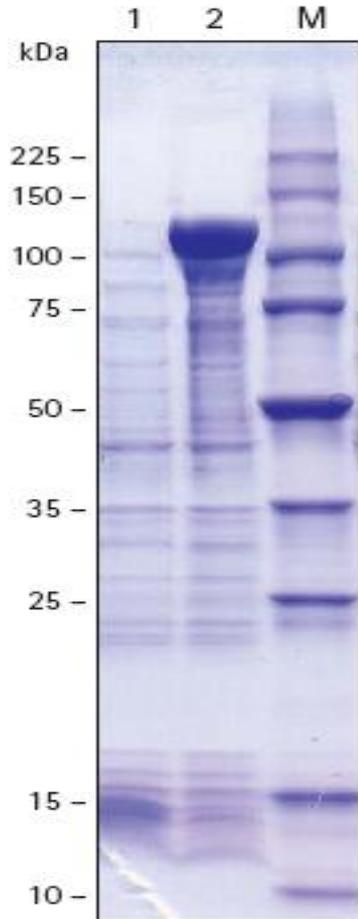
amino acid	codon	fraction in all genes	fraction in Class II
Arg	AGG	0.022	0.003
Arg	AGA	0.039	0.006
Arg	CGG	0.098	0.008
Arg	CGA	0.065	0.011
Arg	CGU	0.378	0.643
Arg	CGC	0.398	0.330
Gly	GGG	0.151	0.044
Gly	GGA	0.109	0.020
Gly	GGU	0.337	0.508
Gly	GGC	0.403	0.428
Ile	AUA	0.073	0.006
Ile	AUU	0.507	0.335
Ile	AUC	0.420	0.659
Leu	UUG	0.129	0.034
Leu	UUA	0.131	0.055
Leu	CUG	0.496	0.767
Leu	CUA	0.037	0.008
Leu	CUU	0.104	0.056
Leu	CUC	0.104	0.080
Pro	CCG	0.525	0.719
Pro	CCA	0.191	0.153
Pro	CCU	0.159	0.112
Pro	CCC	0.124	0.016

Codon usage is expressed as the fraction of all possible codons for a given amino acid. "All genes" is the fraction represented in all 4,290 coding sequences in the *E. coli* genome (6). "Class II" is the fraction represented in 195 genes highly and continuously expressed during exponential growth (7).



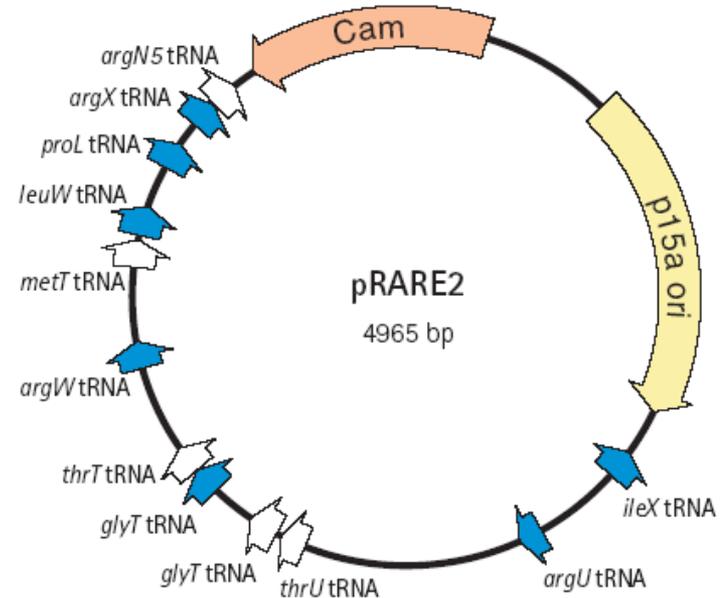
获得全长蛋白，提高产量：Rosetta

克服稀有密码子导致的低产与不完整问题



← β-gal (5 × CGG mutant)

Lane	Sample
1	Rosetta(DE3) total cell extract (induced)
2	Rosetta 2(DE3) total cell extract (induced)
M	Perfect Protein™ Markers, 10–225 kDa



Effect of consecutive CGG rare codons on target protein expression

A pET-15b recombinant plasmid containing five consecutive CGG codons near the 5' end of the β-gal coding region was transformed into Rosetta™(DE3) and Rosetta 2(DE3) cells. The cells were induced with IPTG for 3 hr and harvested by centrifugation.

几种有特色的细胞株

Strain	DrugR	Genotype	Description
Rosetta™ 2	cam	F- ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm lacY1 pRARE	protease deficient, lac permease deficient, rare tRNAs
RosettaBlue™	cam, tet	endA1 hsdR17 (rK12-mK12 +) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proA+B+ lacIqZDM15::Tn10 pRARE	K12, rare tRNAs
Origami™ 2	tet, Str, kan	Dara-leu7697 DlacX74 DphoAPvu II phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F'[lac+(lacIq)pro] gor522::Tn10 trxB::Str,Tet	K12, oxidizing cytoplasm
Origami B	tet, kan	F- ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm lacY1 ahpC gor522::Tn10 trxB::kan	protease deficient, lac permease deficient, oxidizing cytoplasm
Rosetta-gami™	tet, kan, cam	$\Delta ara-leu7697 \Delta lacX74 \Delta phoAPvu$ II <i>phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F'[lac⁺(lacI^q)pro] gor522::Tn 10 trxB::kan pRARE</i>	K12, rare tRNAs, oxidizing cytoplasm
Rosetta-gami B	tet, kan, cam	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm lacY1 ahpC gor522::Tn 10 trxB::kan pRARE</i>	protease deficient, lac permease deficient, rare tRNAs, oxidizing cytoplasm

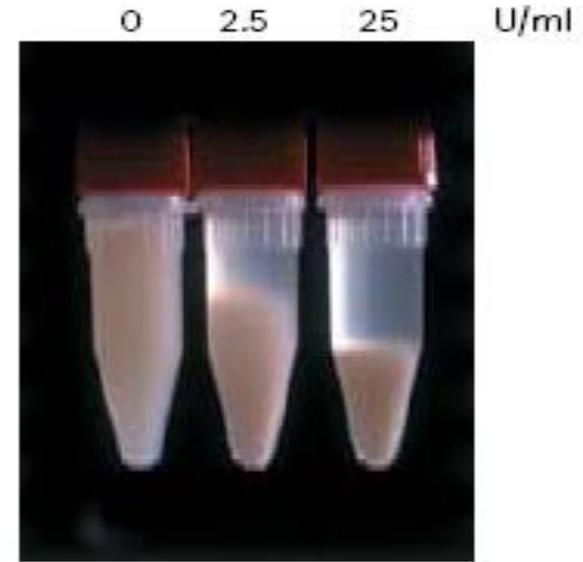
Benzonase[®] 核酸酶减少样品粘度，提高蛋白产率



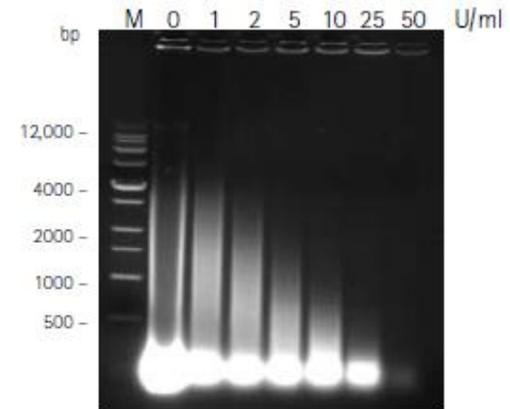
生物工程生产，来自 *Serratia Marcescens*
是2个30 kDa亚基的二聚体

Benzonase 高效去除蛋白产物中的核酸干扰

- 迅速、安全地降低样品粘度
- 减少色谱柱堵塞、耗损
- 减少样品分离中各种物质的相互干扰
- 提高纯化速度和效率
- 数据标准化

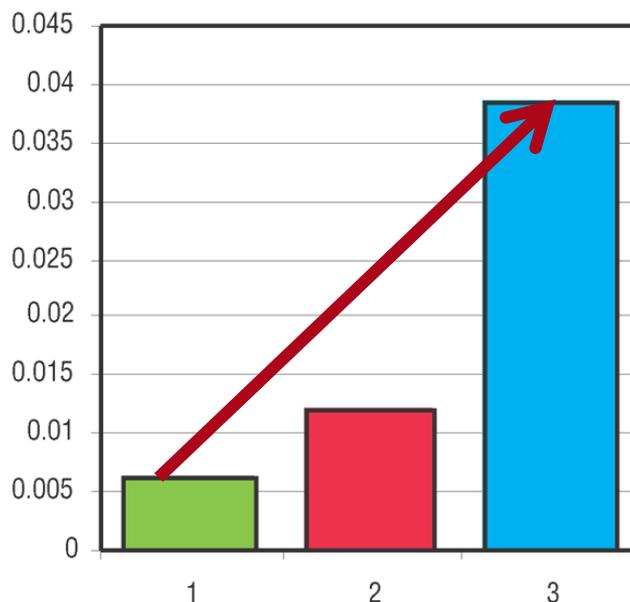
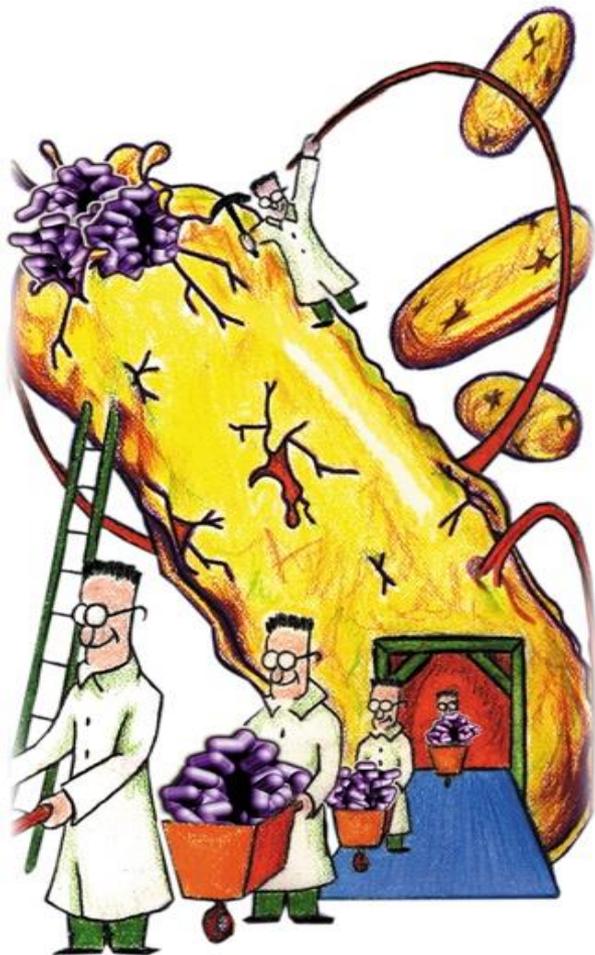


Viscosity reduction by Benzonase



替代超声波的抽提试剂大幅提高活性蛋白产量

抽提分离条件会带来活性蛋白产量成倍的差异

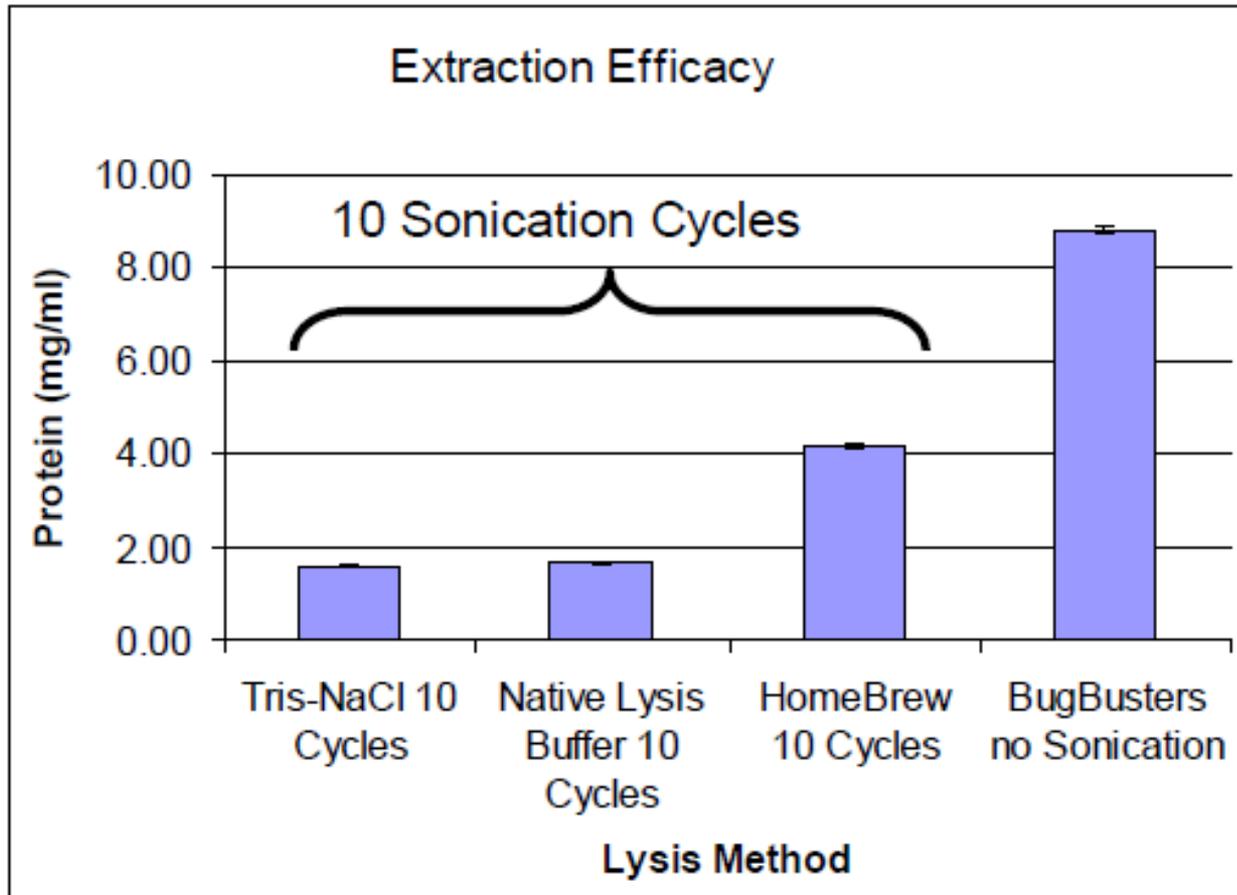


pET41a (+) 活性GST重组蛋白含量检测:

- (1) 超声波处理
- (2) 实验室常用裂解液
- (3) BugBuster温和抽提试剂

BugBuster对于活性要求高的样品、多样本平行处理、小体积样品、线性缩放处理等有着特别的价值

替代超声波的抽提试剂大幅提高活性蛋白产量



实验室常用溶菌配方往往还是离不开超声波处理，然而释放蛋白的效果，以及超声对于蛋白的损害可能来自剪切力、气泡张力、热效应等等

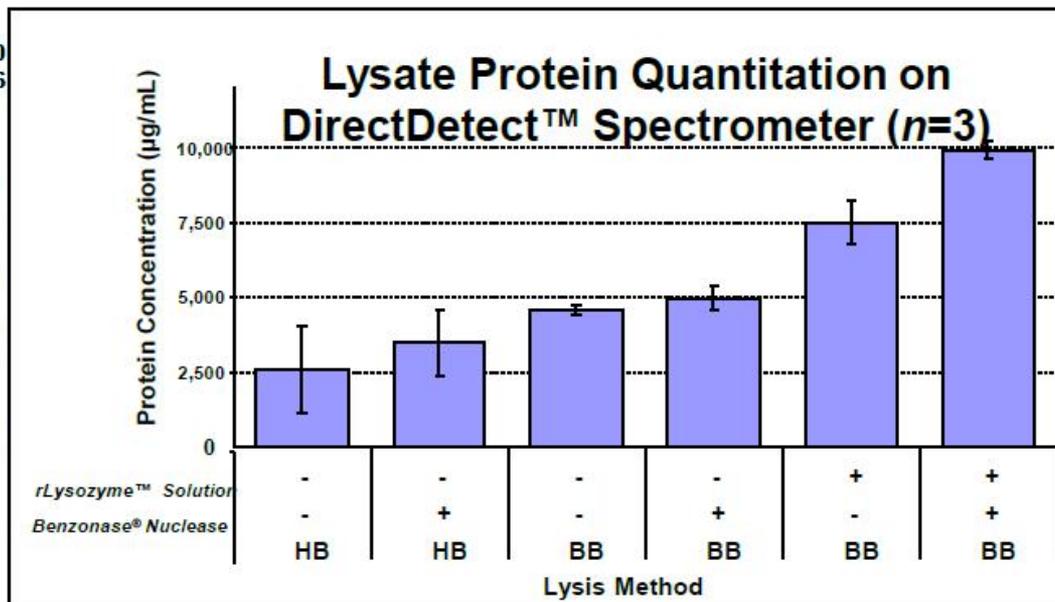
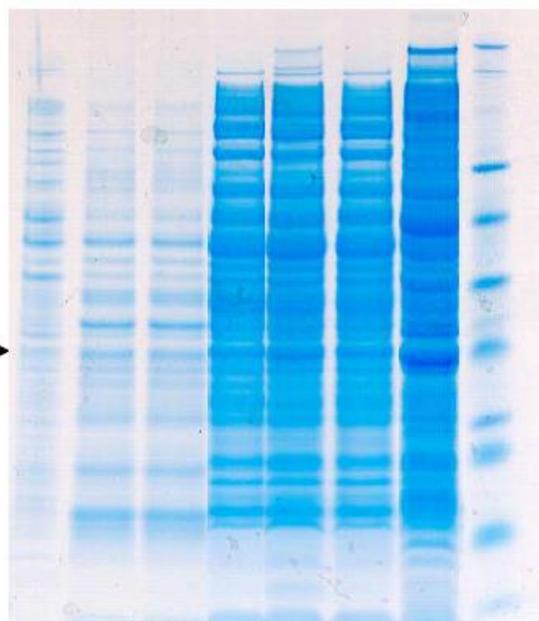
替代超声波的抽提试剂大幅提高活性蛋白产量

5 μ L Lysate (1 mL total)

BugBuster® 与实验室常用
细菌裂解配方使用效果比较

		-	-	-	-	+	+	
		-	+	-	+	-	+	
				BB	BB	BB	BB	
		HB	HB	BB	BB	BB	BB	
M	NI	HB	HB	BB	BB	BB	BB	M

rLysozyme™ Solution
Benzonase® nuclease



- BugBuster® Master Mix 蛋白产量显著提高
- Benzonase® 核酸酶和 rLysozyme™ 高效溶菌酶与 BugBuster 一起使用综合效果好
- 没有 Benzonase® 核酸酶处理时常常遇到样品粘稠问题

亲和纯化

His•Tag[®] sequence

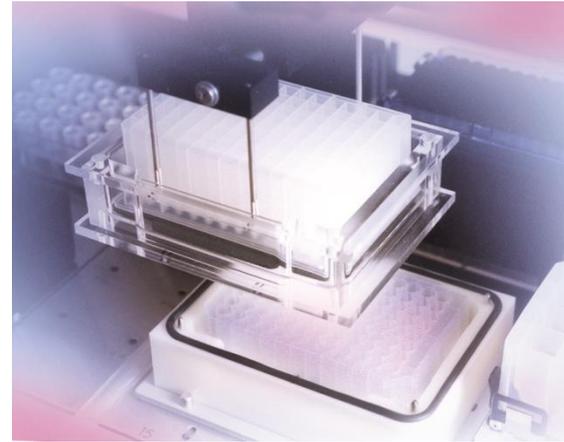
GST•Tag[™] sequence

S•Tag[™] sequence

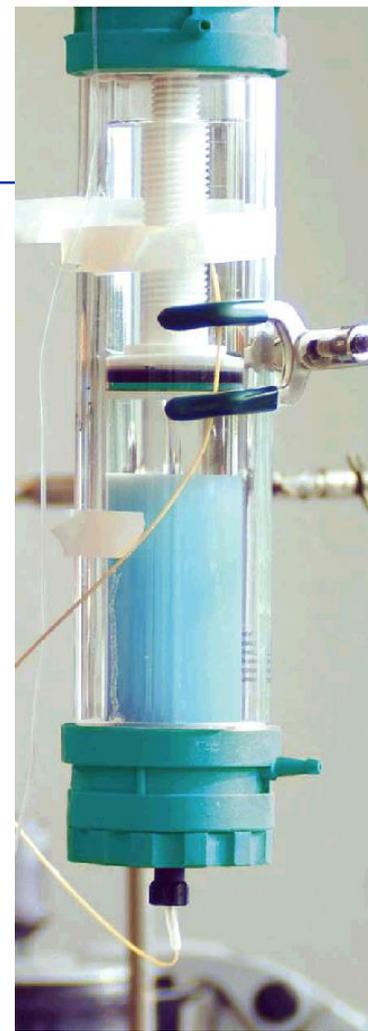
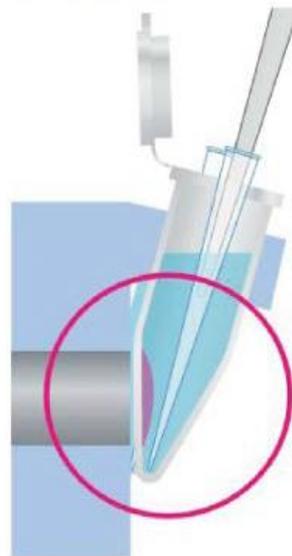
HSV•Tag[®] sequence

T7•Tag[®] sequence

Strep•Tag sequence



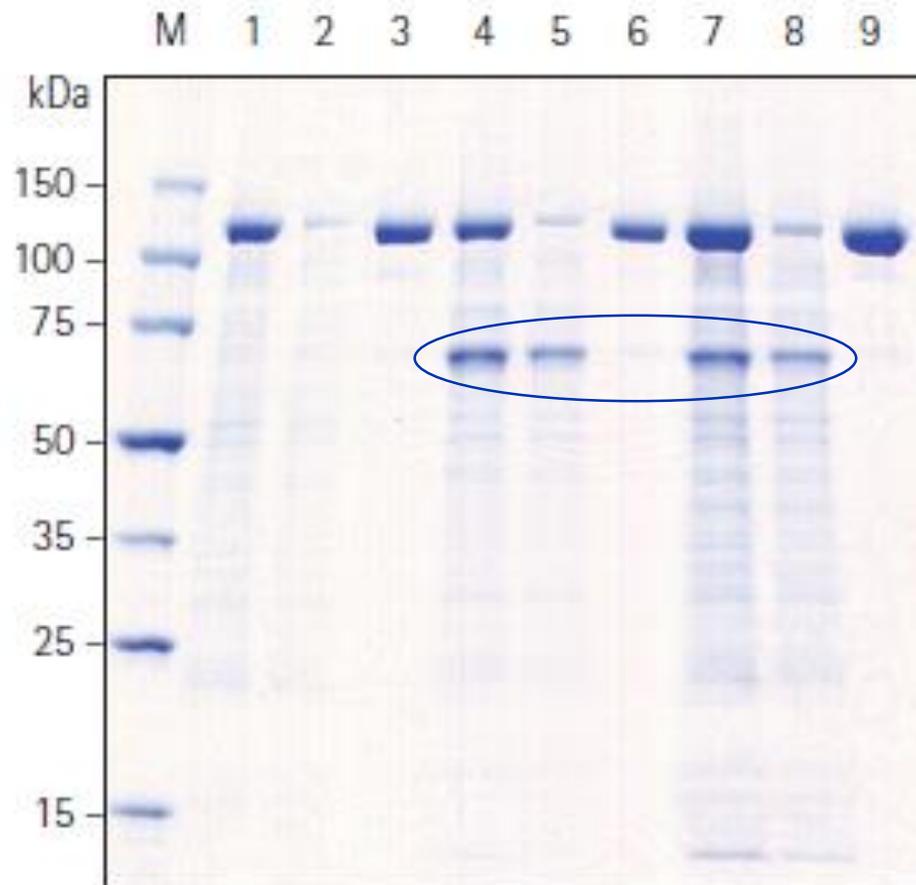
磁珠方法



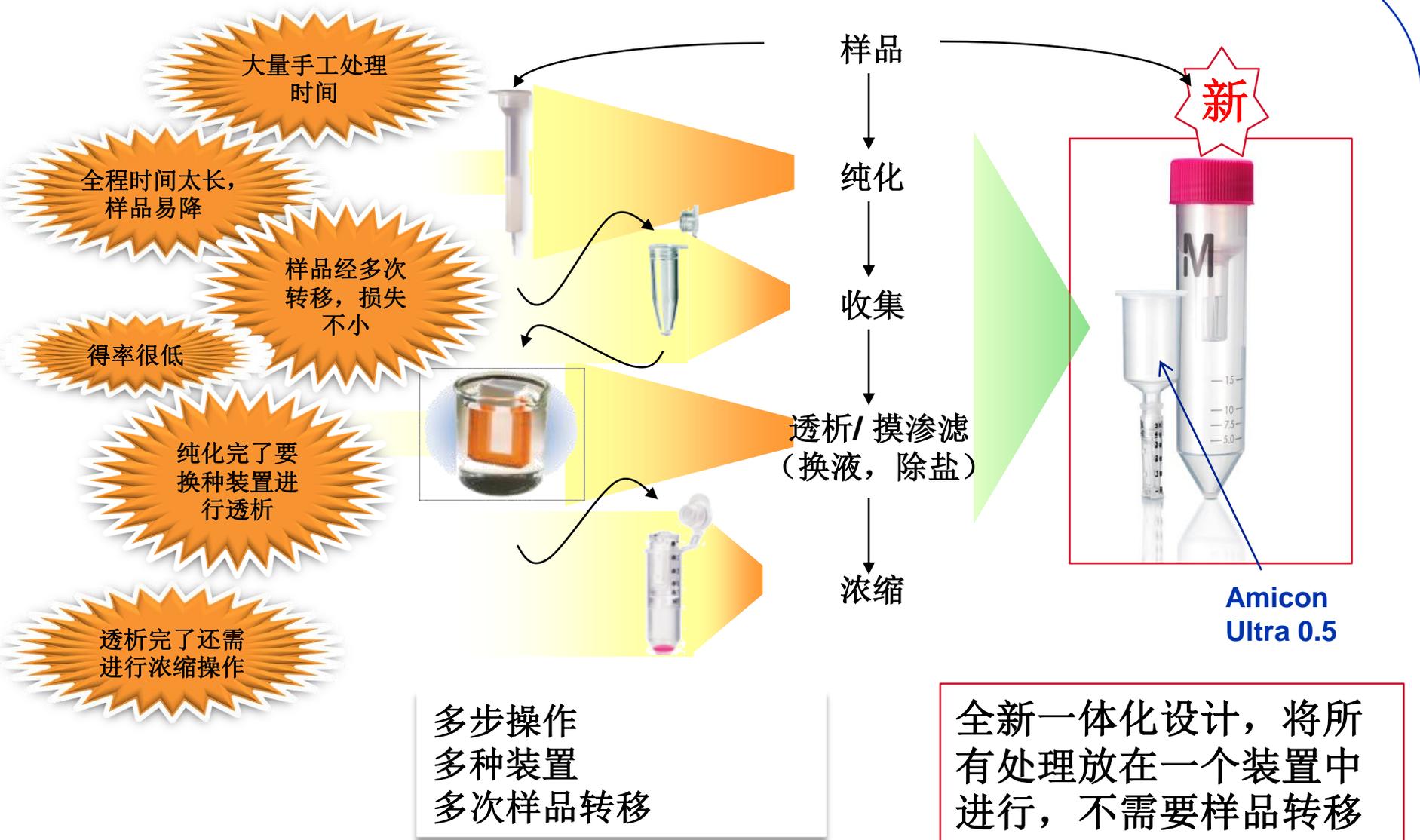
新型磁珠法提
高了操作通量

获得高产完整一致的目的蛋白

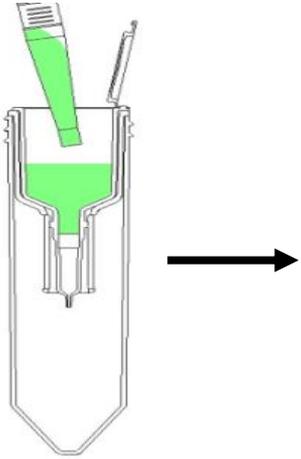
- 表达全长蛋白
- 减少蛋白降解或被剪切
- 减少核酸干扰
- 特异性好的亲和纯化方法
- 合适的树脂用量



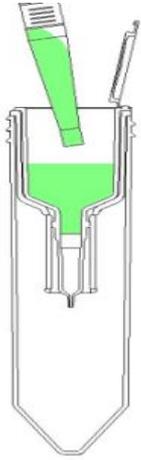
亲和纯化-浓缩-除盐/换液: Amicon Pro



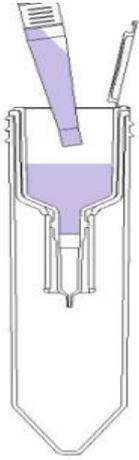
漂洗树脂



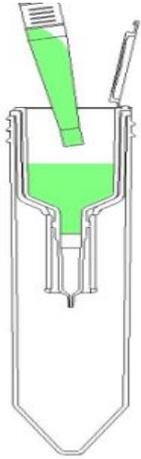
漂洗树脂



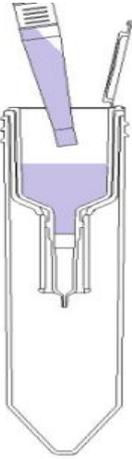
加入粗样
与树脂孵育



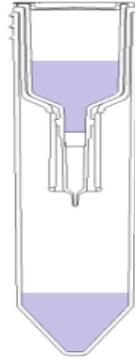
漂洗树脂



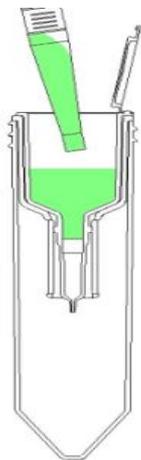
加入粗样
与树脂孵育



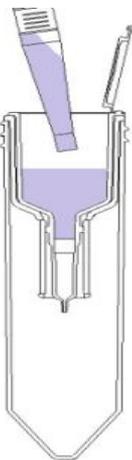
漂洗



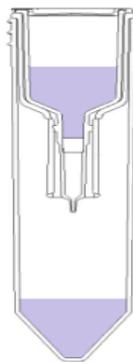
漂洗树脂



加入粗样
与树脂孵育



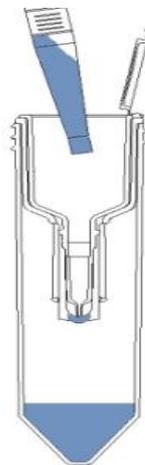
漂洗



接上
AU0.5



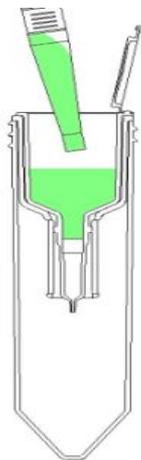
洗脱并
浓缩



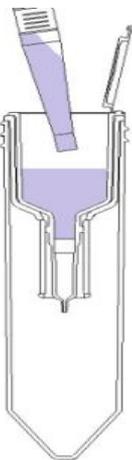
你所需要的置于合适浓度、浓缩好的蛋白产物就这样轻松得到啦！

浓缩好的洗脱样品

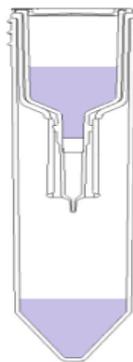
漂洗树脂



加入粗样
与树脂孵育



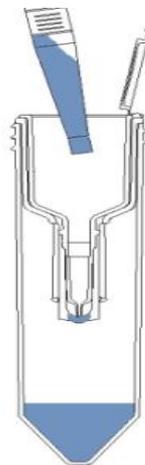
漂洗



接上
AU0.5



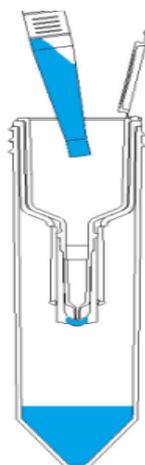
洗脱并
浓缩



换液

(选做)

换液和浓缩



反转
离心



浓缩好的洗
脱样品

换液并浓缩好的
最终蛋白产物

你所需要的置于合适缓冲液背景下的、浓缩好的蛋白产物就这样轻松得到啦！

应用举例(1): 亲和纯化+换液+/-浓缩

~2mg蛋白中通量操作的新标准方法



Amicon Pro与传统亲和纯化方法操作比较

纯化+浓缩+换液	0.5ml甩柱+超滤管	Amicon Pro
操作时间*	67min	29min
离心次数	12	6
样品转移次数	1	0

*两种方法中都有的60min孵育时间没有计算在内

应用举例(2)：透析换液——以抗体标记为例

操作步骤	透析法换液	Amicon Pro
缓冲液置换	过夜	15min
FITC标记	3h	30min
移除未标记的FITC并换液	过夜	15min
总用时	3天	1h
抗体得率	39%	72%



Amicon Pro与传统抗体标记方法操作比较		
抗体标记*	标记前后用透析法换液	Amicon Pro
操作时间	3天	60min
操作步骤	11	5
样品转移次数	3	0
起始抗体需要量	1mg	50ug

Amicon Pro客户反馈



- 厦门大学细胞应激国家重点实验室 张熠玮

研究方向：肿瘤细胞信号转导

采用Amicon Pro前您做亲和纯化的方法是: AKTA纯化平台 (√)

操作步骤少、简单、容易上手；一体化设计没有转移，样品丢失少、结果稳定；设计灵活，可进行多种应用；在纯化条件已知的情况下，使用体验大大优于AKTA纯化平台。

Amicon Pro将成为日常使用产品 (√)

磁珠法IP, coIP (√) 磷酸化蛋白抽提与分析 (√)

Western Blotting (√)

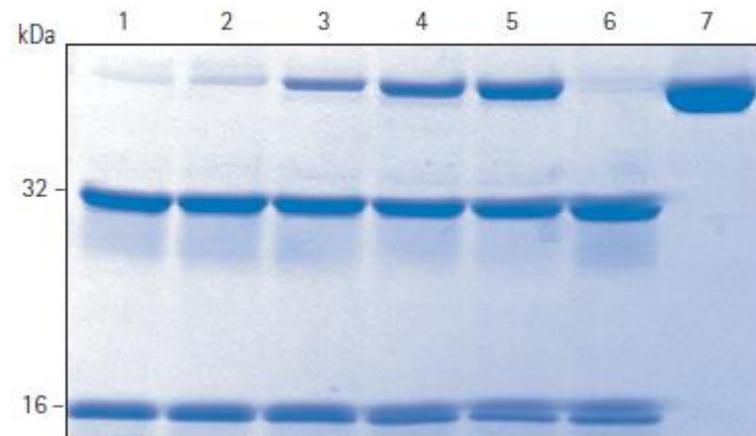
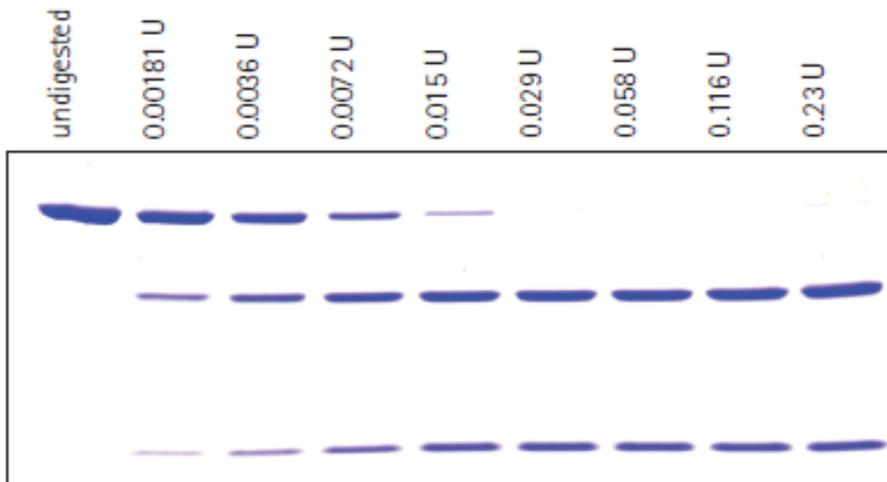
去除目的蛋白上的多余序列

Thrombin Leu Val Pro Arg **Gly Ser**

Factor Xa Ile Glu Gly Arg

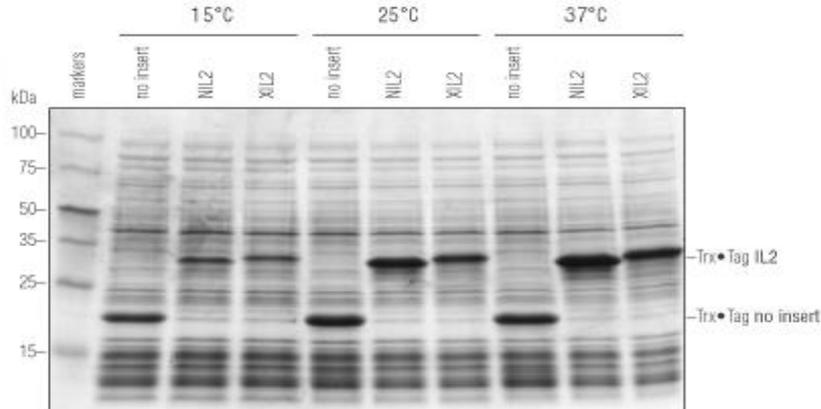
Enterokinase Asp Asp Asp Asp Lys

HRV 3C Leu Glu Val Leu Phe Gln **Gly Pro**

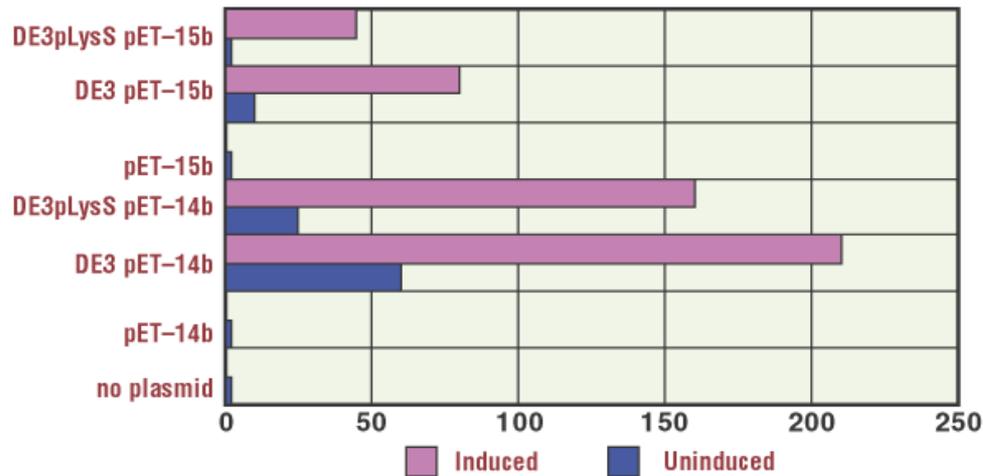


Analysis of pET-32a(+) IL-2 Clones Induced at 15°, 25° and 37°

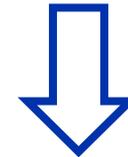
A. Soluble fraction



Effect of Host/Vector Combination on Expression Level

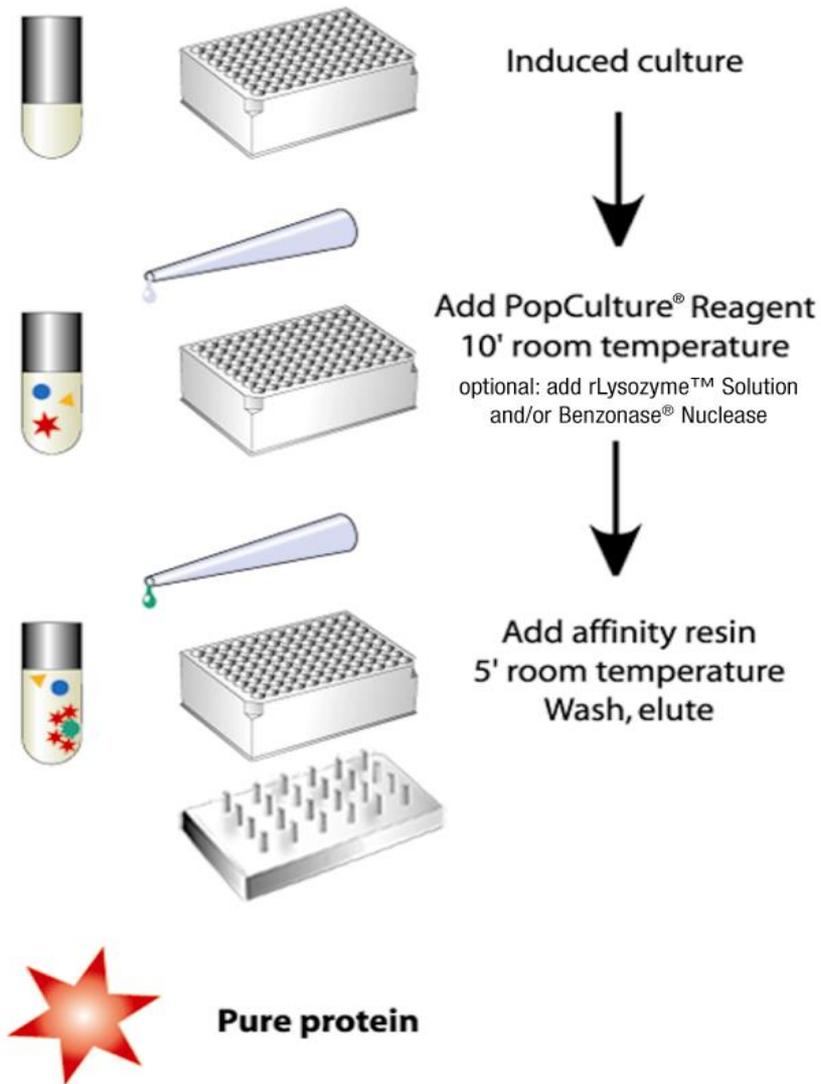
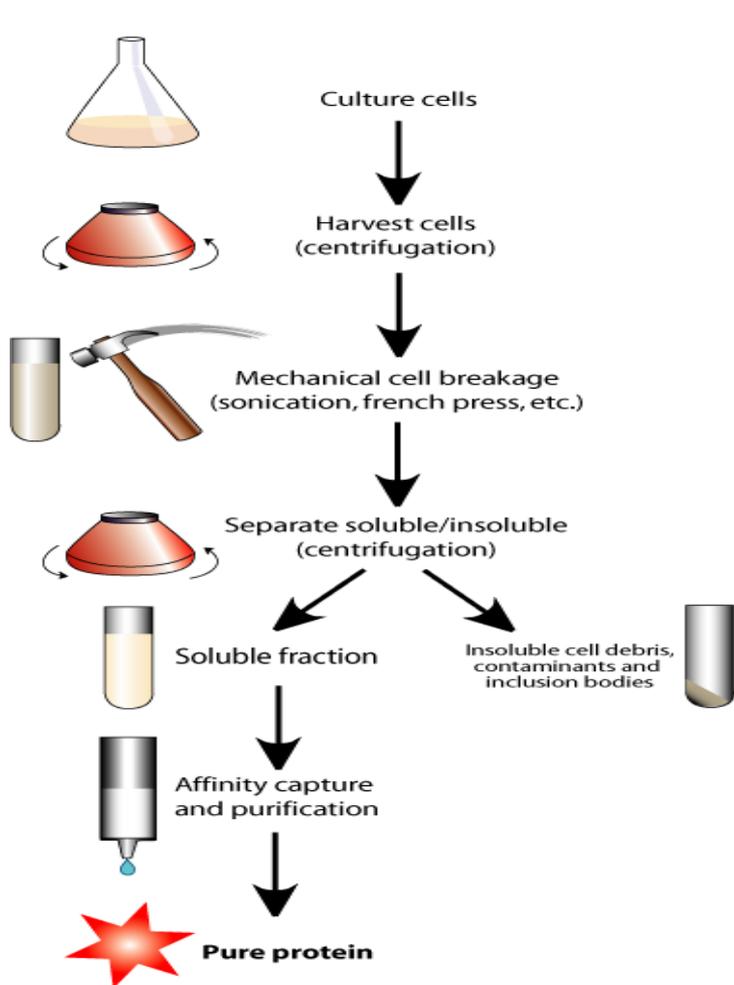


载体-宿主-发酵条件
组合多因素互动带来
不同结果，数据平行
比较是个问题！



高通量克隆表达
抽提纯化与分析

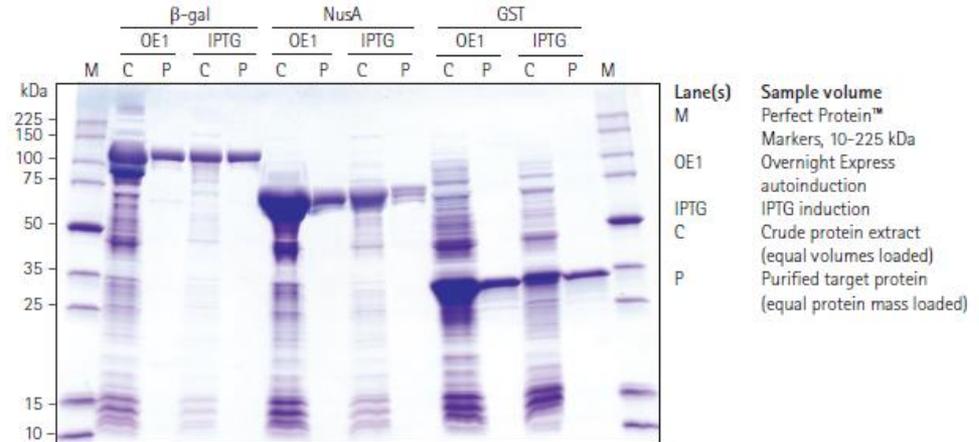
高通量诱导表达、抽提、纯化策略



Overnight Express™ 自动诱导表达培养基



- 应用于pET等乳糖操纵子诱导表达系统
- 完全不需要进行OD值监控、多次放大和添加IPTG等步骤
- 更高的细胞浓度、更高活性蛋白产量



Expression and purification of target proteins from cultures induced with Overnight Express System 1 (OE1) versus IPTG

Overnight Express™ 培养基提高蛋白产量、活性和操作通量

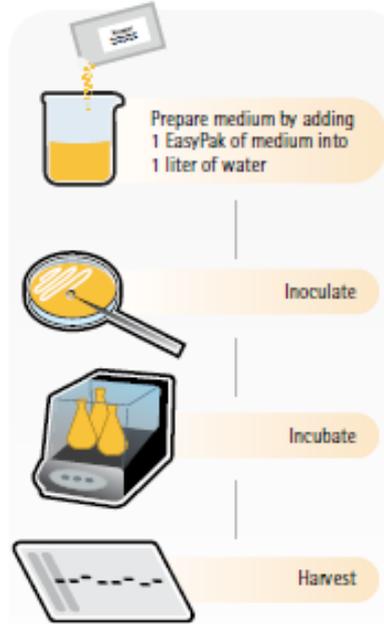
Medium	Protein	Cell Harvest OD ₆₀₀		Pure Protein Yield ¹	
		OE1 ²	IPTG ³	OE1	IPTG
TB	β-gal	20.7	9.7	675	225
TB	NusA	20.0	8.5	690	240
TB	GST	20.2	15.2	750	255



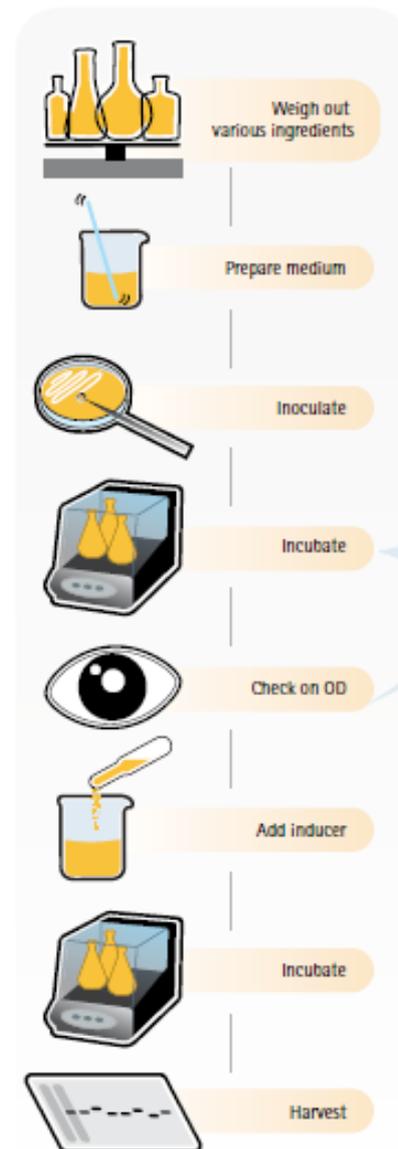
Overnight Express™ 自动诱导表达培养基



Overnight Express™ Protocol



Conventional Protocol



Overnight Express™
systems...
for a good
night's sleep

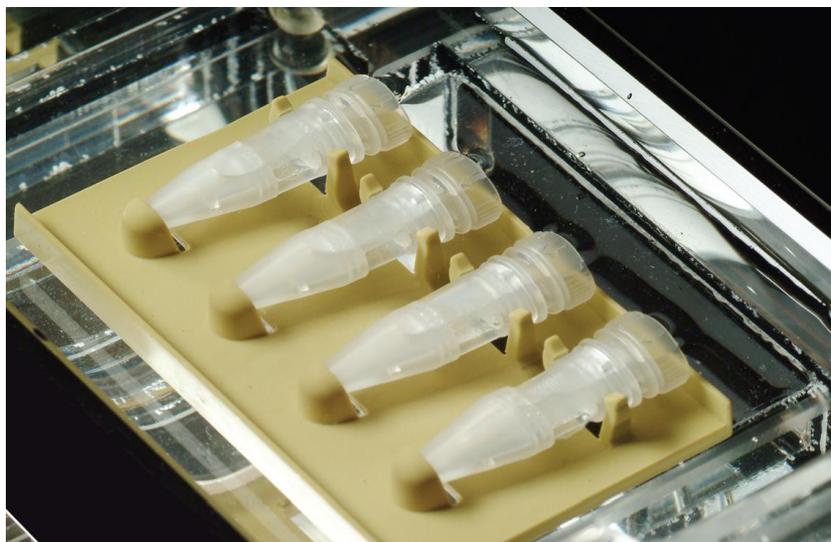
原核表达系统

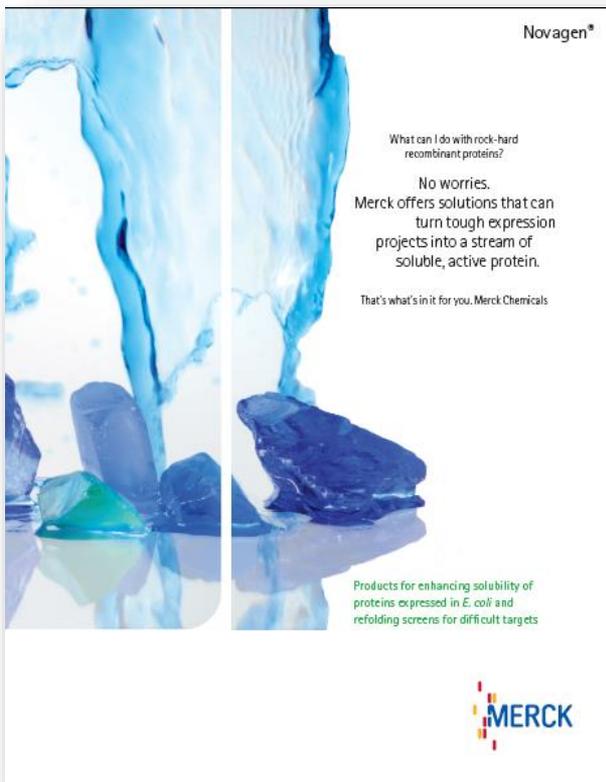
包涵体/无活性是显著的难题



D-Tube™ 透析管——复性好帮手

- 旋盖式透析管设计
- 没有样品渗漏或丢失
- 采用移液器操作，简便易行
- 核酸和蛋白电泳洗脱
- 样品回收率高





Novagen®

What can I do with rock-hard recombinant proteins?

No worries. Merck offers solutions that can turn tough expression projects into a stream of soluble, active protein.

That's what's in it for you, Merck Chemicals

Products for enhancing solubility of proteins expressed in *E. coli* and refolding screens for difficult targets



MERCK

Novagen原核表达系统

从载体、共表达策略、衍生菌株、体外复性.....

提供获取更高产的**活性可溶蛋白**解决方案

极具潜力的真核蛋白表达平台

—— 默克Novagen[®]昆虫表达系统工具进展简介

Allen He

Merck Millipore China

昆虫细胞表达系统成为受人关注的首选平台



基因组大：外源插入片段可达12kb；可构建同时表达多个基因的载体

灵活的表达方案：早期或晚期启动子表达效果不同

能获得重组蛋白高水平的表达：最高可达到细胞总蛋白的50%

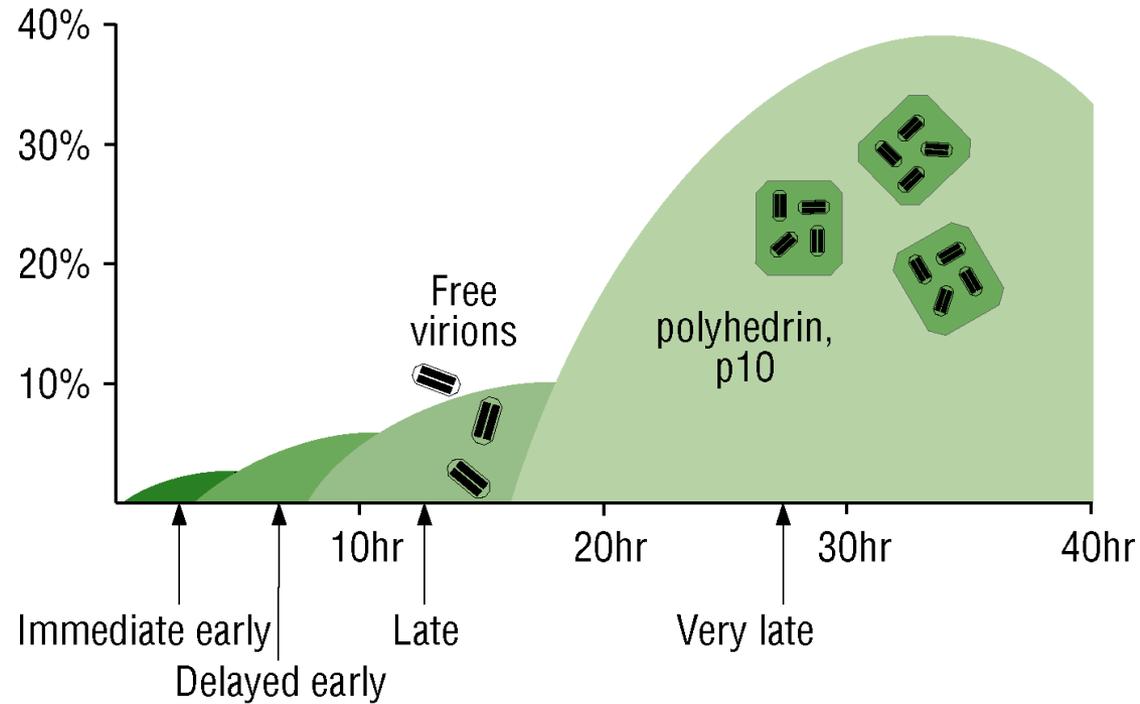
有较完善的翻译后加工过程：绝大多数产物具有生物活性

可用于蛋白晶体研究

技术简便、生产成本低、无病原性：遗传学上是安全的，用于医药产品开发

但是，要评估昆虫细胞表达平台是否对特定
蛋白合适，我们曾经需要1个月做准备 😞

杆状病毒启动子



极早期/早期启动子: **ie, gp64**

晚期/极晚期启动子: **polh, p10**

Novagen的3套昆虫表达系统

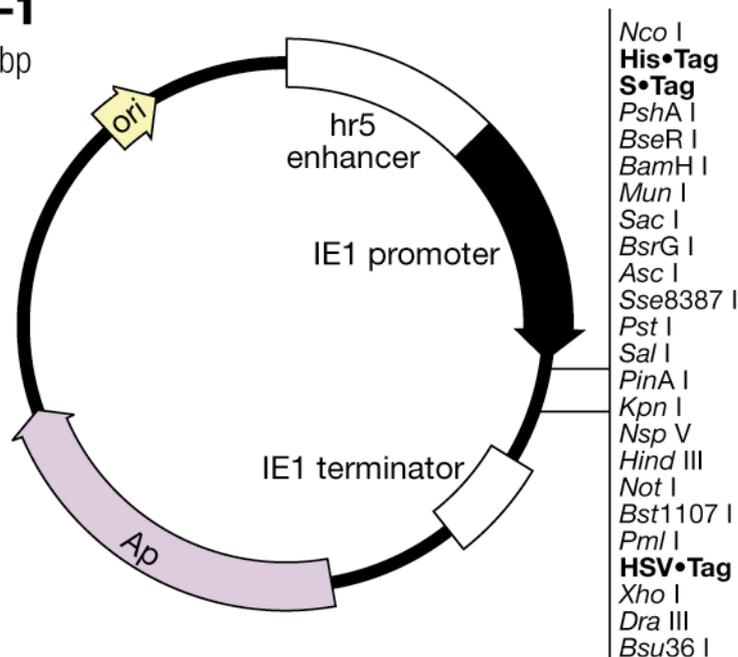
—— 满足各种课题设计之需

Plasmid-based (transfection)		Recombinant Baculovirus (infection)			
InsectDirect™ System		BacMagic™ System	BacVector® System		
Day 1	Transfect Sf9 Insect Cells with pEx™ or pEx/Bac™ recombinant plasmid for protein expression	Day 1	Co-transfect insect cells with recombinant transfer plasmid plus AcNPV BacMagic™ DNA		
Day 3	Proceed with purification	Day 5	Harvest recombinant baculovirus; screen for expression; amplify viral stock (titer stock, optional)		
		Day 8	Infect insect cells and express protein		
		Day 11	Proceed with purification		
				Day 1	Co-transfect insect cells with recombinant transfer plasmid plus linearized AcNPV BacVector® DNA
				Day 4	Choose plaque and replate
				Days 8	Choose plaque and amplify
				Day 11	Screen for expression; amplify
				Day 14	Titer viral stock; optimize MOI (optional)
				Day 18	Infect insect cells and express protein
				Day 21	Proceed with purification
					

InsectDirect™载体

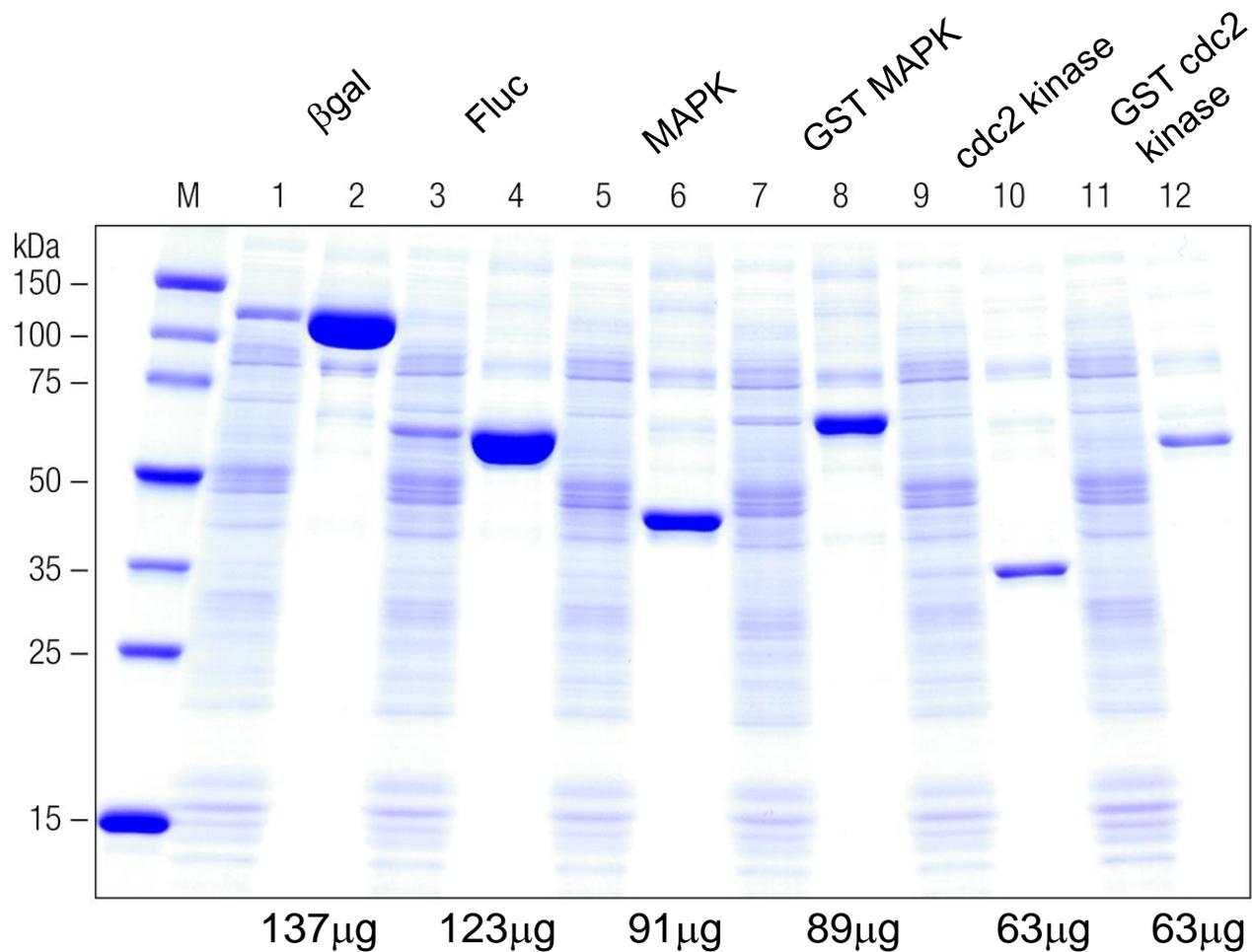
48 hours
VERSUS
21 days

pIEx-1
3897 bp



载体	启动子	有无信号肽	N端标签	C端标签	蛋白酶切位点	货号
pIEx-1	hr5/ie1	No	His•Tag/S•Tag	HSV•Tag	Tb/EK	71241-3
pIEx-2	hr5/ie1	No	GST•Tag/ His•Tag/S•Tag	HSV•Tag	Tb/Ek	71238-3
pIEx-3	hr5/ie1	Yes	GST•Tag/ His•Tag/S•Tag	HSV•Tag	Tb/Ek	71243-3
pIEx-4	hr5/ie1	No	None	His•Tag/S•Tag	None	71235-3
pIEx-5	hr5/ie1	Yes	None	His•Tag/S•Tag	None	71242-3
pIEx-6	hr5/ie1	No	His•Tag	S•Tag	Ek	71333-3
pIEx-7 Ek/LIC*	hr5/ie1	No	His•Tag	S•Tag	Ek	71339-3
pIEx-8	hr5/ie1	No	Strep•Tag II	His•Tag	Ek	71555-3
pIEx-9	hr5/ie1	No	Strep•Tag II	His•Tag	3C	71556-3
pIEx-10	hr5/ie1	Yes	Strep•Tag II	His•Tag	Ek	71557-3

pIEx表达产量: 10ml发酵



蛋白激酶同源异构体表达实验

将多种突变基因克隆到pIEx™-1Ek/LIC载体：1天

纯化扩增了的质粒

采用昆虫细胞专用GeneJuice™ 转染试剂将重组质粒转染10ml Sf9悬浮培养细胞

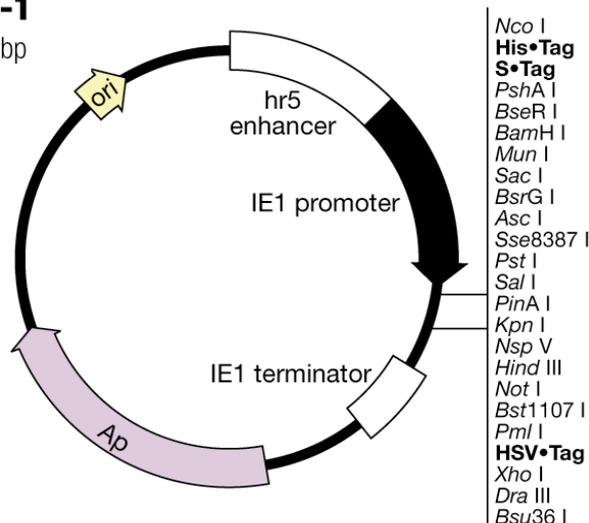
转染48小时后以昆虫细胞专用PopCulture®抽提试剂裂解细胞：2-3天

用Ni-NTA His•Bind®亲和纯化重组蛋白

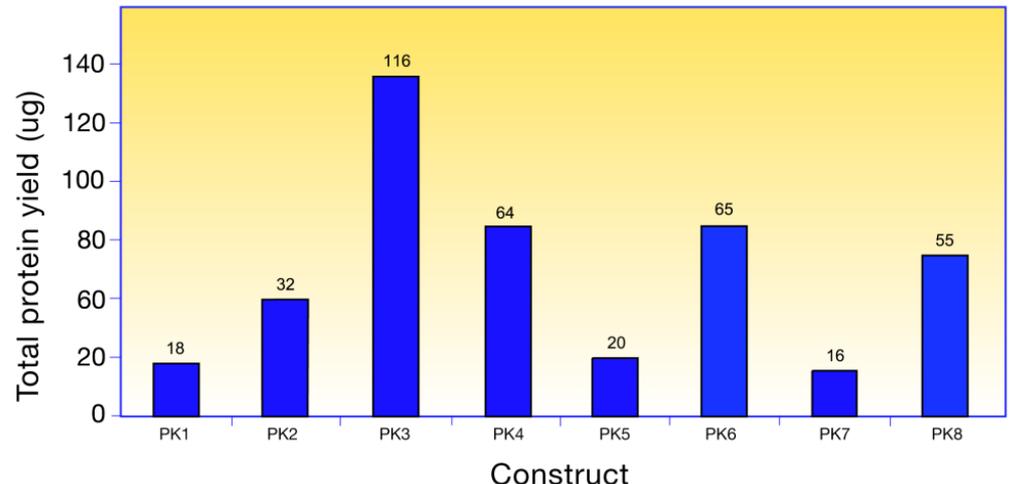
从500ul样品中取10μl跑10-20%梯度胶分析：1天

—— 共1周

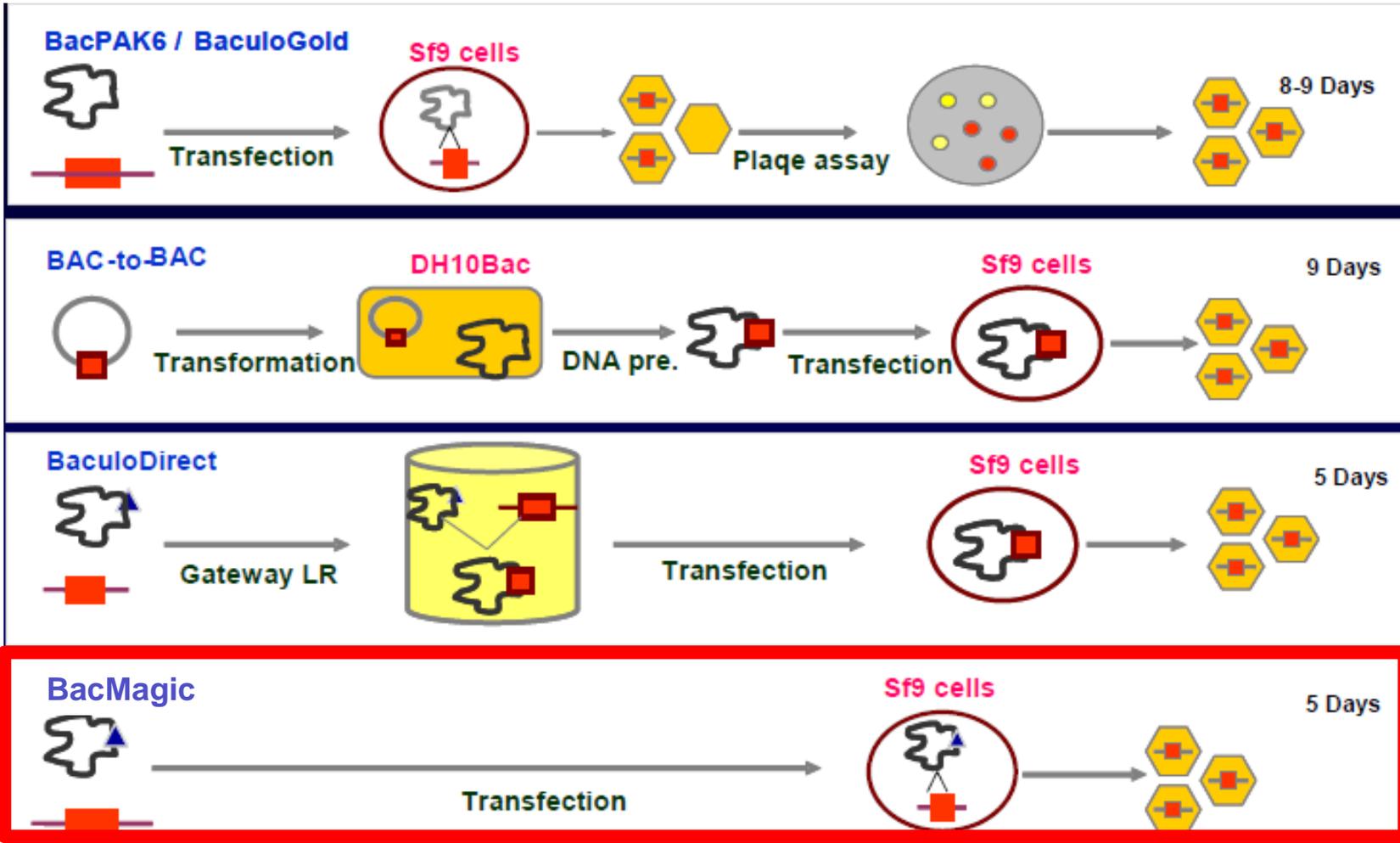
pIEx-1
3897 bp



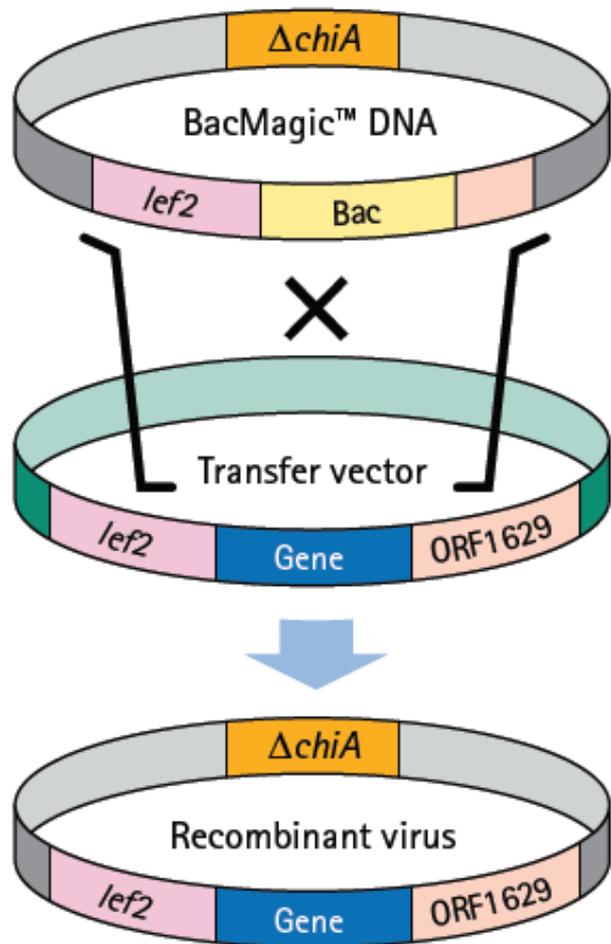
Purified protein kinases from pIEx™-1



几种常见的重组杆状病毒制备系统的比较



BacMagic™: 100%阳性克隆的杆状病毒系统

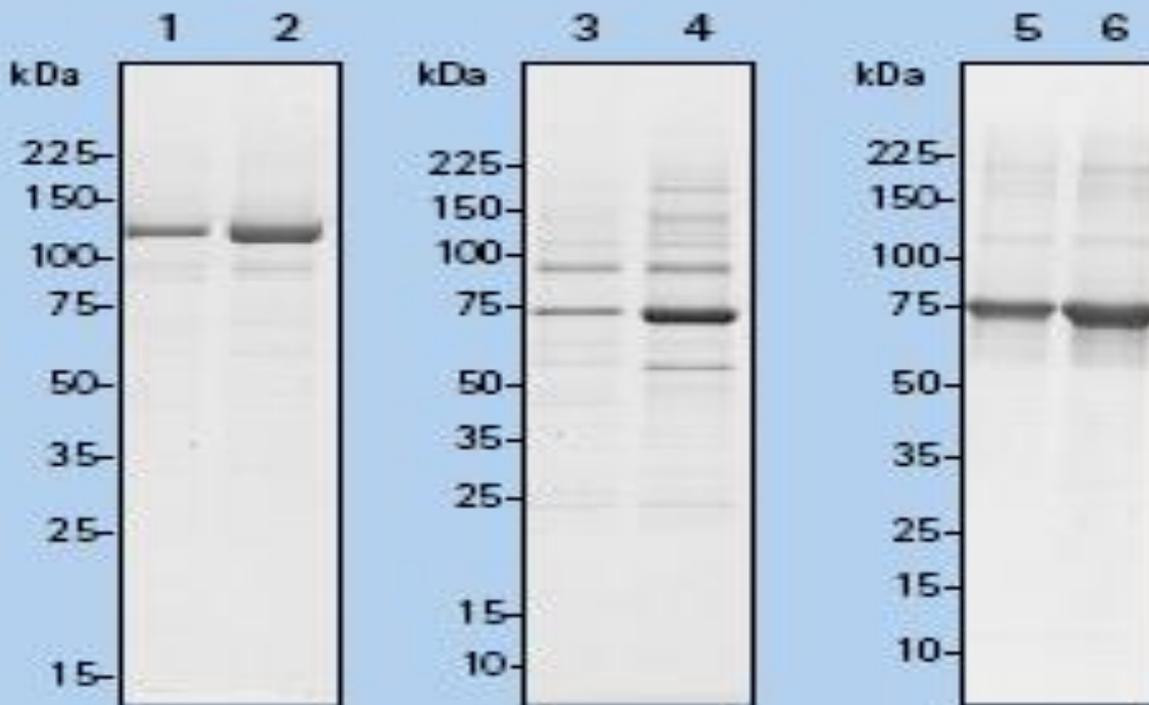


- BacMagic™ DNA在昆虫细胞中与基因供体质粒同源重组，**不需要繁琐耗时的噬斑纯化操作**；
- 源于AcNPV基因组，**ORF1629被删除**，确保只有重组子能在昆虫细胞中复制；
- 包括BacMagic， BacMagic-2和 BacMagic-3三种病毒骨架，删除非必需基因和有害基因，以提高目的蛋白产量、翻译后加工和活性
- 与各种带有外源基因的转移质粒载体同源重组，获得重组病毒：**pBAC™, pTriEx, pIEx/Bac**

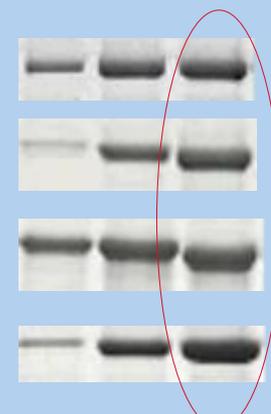
BacMagic™ 3产量为目前所有产品中最高

- BacMagic™ DNA在昆虫细胞中与基因供体质粒同源重组，**不需要繁琐耗时的噬斑纯化操作**；
- BacMagic-3 病毒骨架**删除5个非必需基因和有害基因**，以提高目的蛋白产量、翻译后加工和活性

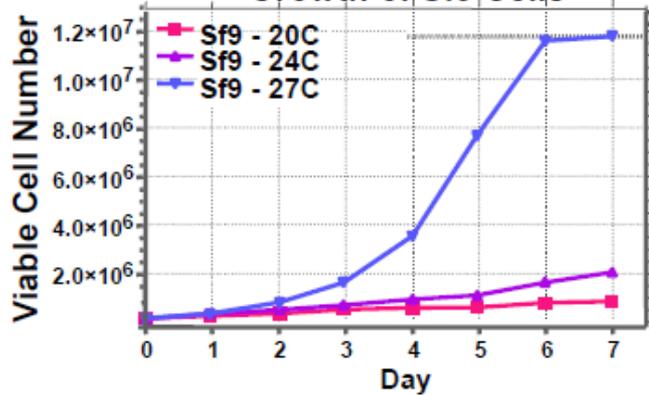
Figure 1. Expression comparison between BacMagic and BacMagic-2



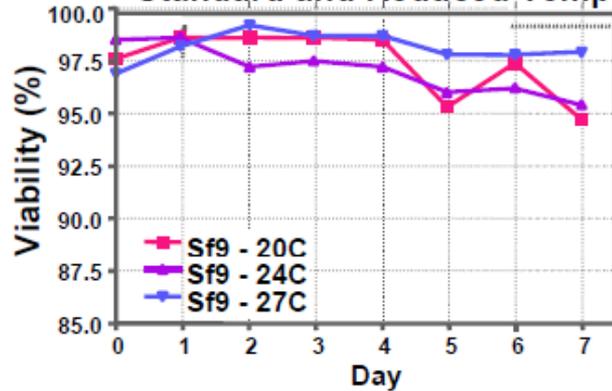
已经升级成
BacMagic 3，
产量继续显著
提高！



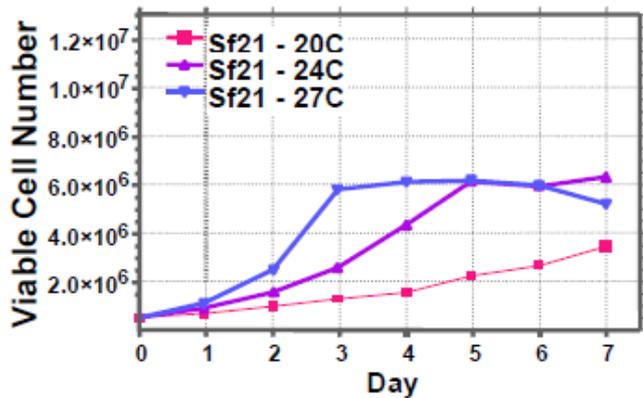
Standard and Reduced Temperature Growth of Sf9 Cells



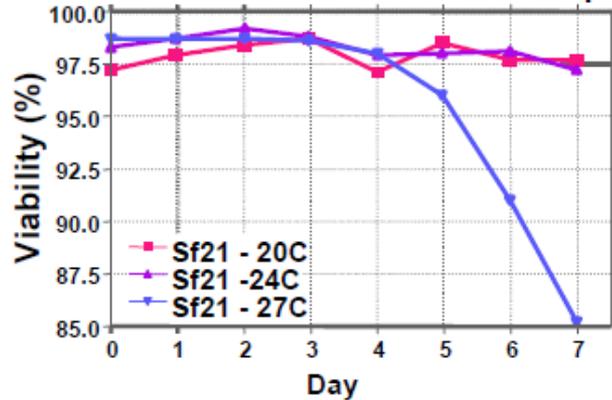
Viability of Sf9 Cells - Standard and Reduced Temps



Standard and Reduced Temperature Growth of Sf21 Cells



Viability of Sf21 Cells - Standard and Reduced Temps



Data from: Francis Rajamohan
(Pfizer Global Research and Development)

昆虫表达系统易于实现自动化规模放大



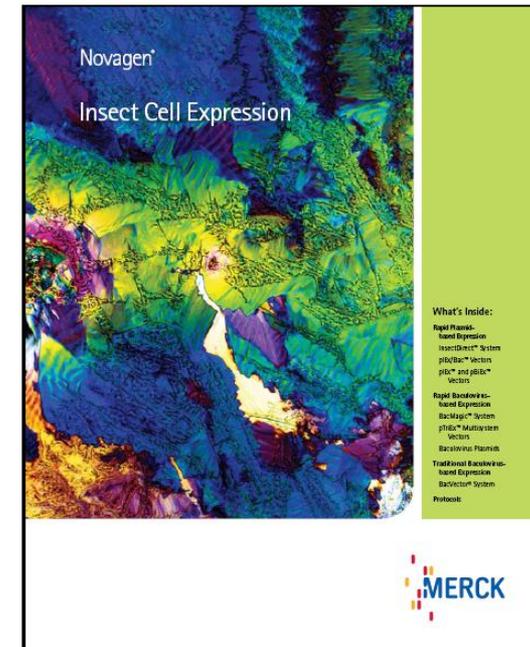
哺乳动物
细胞培养



- 不用搅拌
- 不用灭菌
- 不用清洁
- 不用各种管道
- 停工期短
- 维护费用低 —— 从1L到100L !!

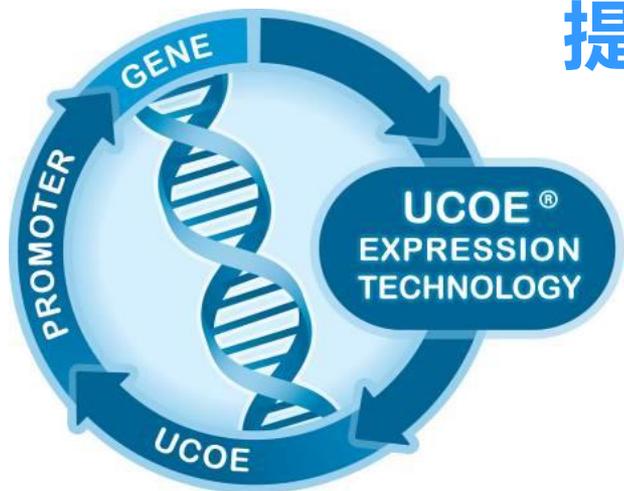
昆虫细胞表达手册

- InsectDirect Plasmid
- BacMagic
- pTriEx
- Insect Cells
- Insect GeneJuice™ Transfection Reagent
- BacPlaque Agarose
- FastPlax Titer Kit
- Medium
- Insect PopCulture® Reagent
- Insect RoboPop Ni-NTA His.Bind Purification Kit



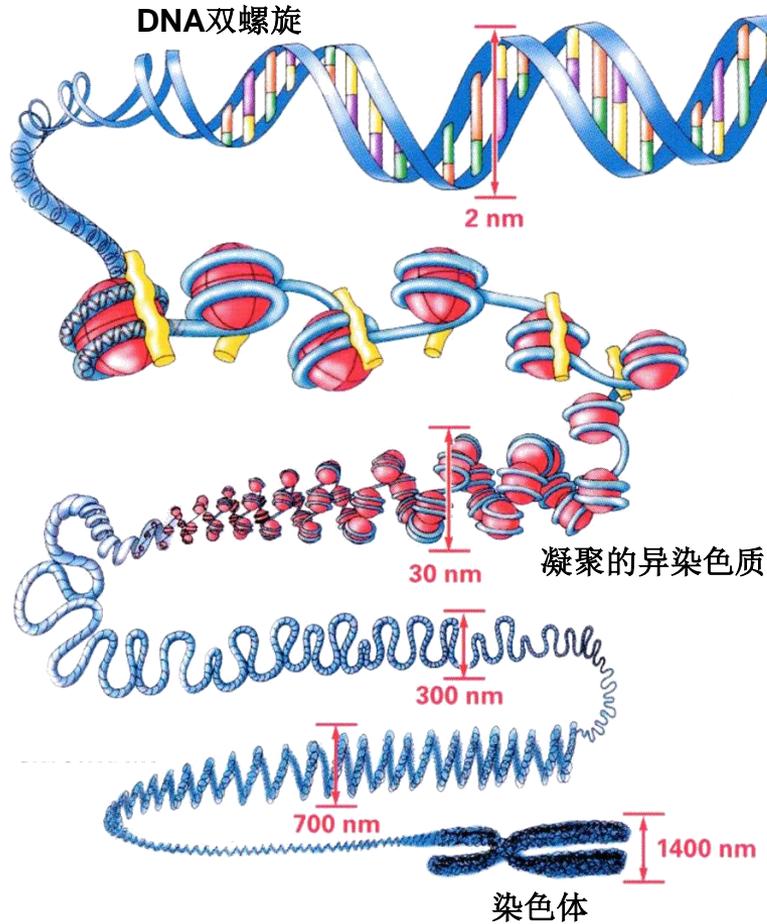
UCOE[®] 哺乳动物细胞表达技术

提高外源蛋白表达产量



Allen He

外源基因在哺乳动物细胞中随机整合



外源蛋白实际表达情况依赖于其整合到染色体的位置和这部分染色质的结构

哺乳动物细胞的染色质常常是关闭、紧密的状态

× 转录沉默

采用传统载体，绝大多数整合后因凝聚的异染色质结构而造成表达受限

× 导致基因沉默 & 没有产量的整合

UCOE[®]哺乳动物细胞基因表达技术

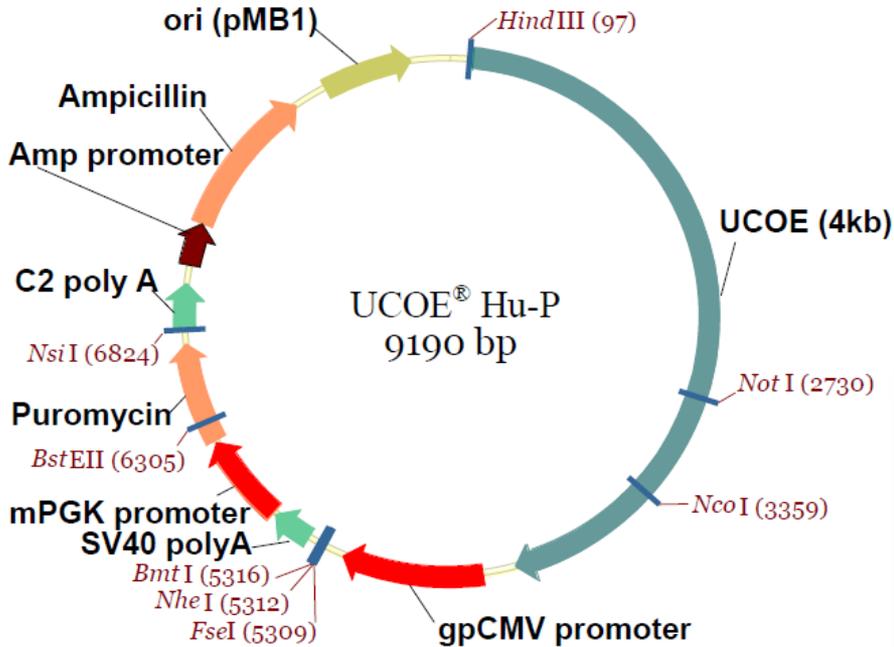
泛染色质开放元件『**Ubiquitous Chromatin Opening Element (UCOE)**』因影响染色质结构而使稳定转染细胞中的外源基因表达得到有效改善和提高。

UCOE是一个小的DNA片段，源于看家基因的调控区域；UCOE有效防止基因沉默，不论整合到染色质什么位置，目的基因都能得到持续稳定、高水平表达。受其控制的基因能很好地克服“位置效应”而保持活跃的转录状态，从而使目的蛋白能在宿主细胞中获得最高产的表达。

独特的优势：

- 30天内获得克/L级目的蛋白，发酵规模达100L（是传统载体的20倍以上）
- 筛选稳定表达克隆时间大大缩短（1-2个月）
- 与CHO细胞、CMV启动子一起构成更优化的蛋白工业化生产体系
- 细胞稳定传代达130代以上
- 用于抗体、EPO、GPCRs、酶、细胞因子等工业化生产

载体的结构：UCOE[®] Human 4 kb Puro

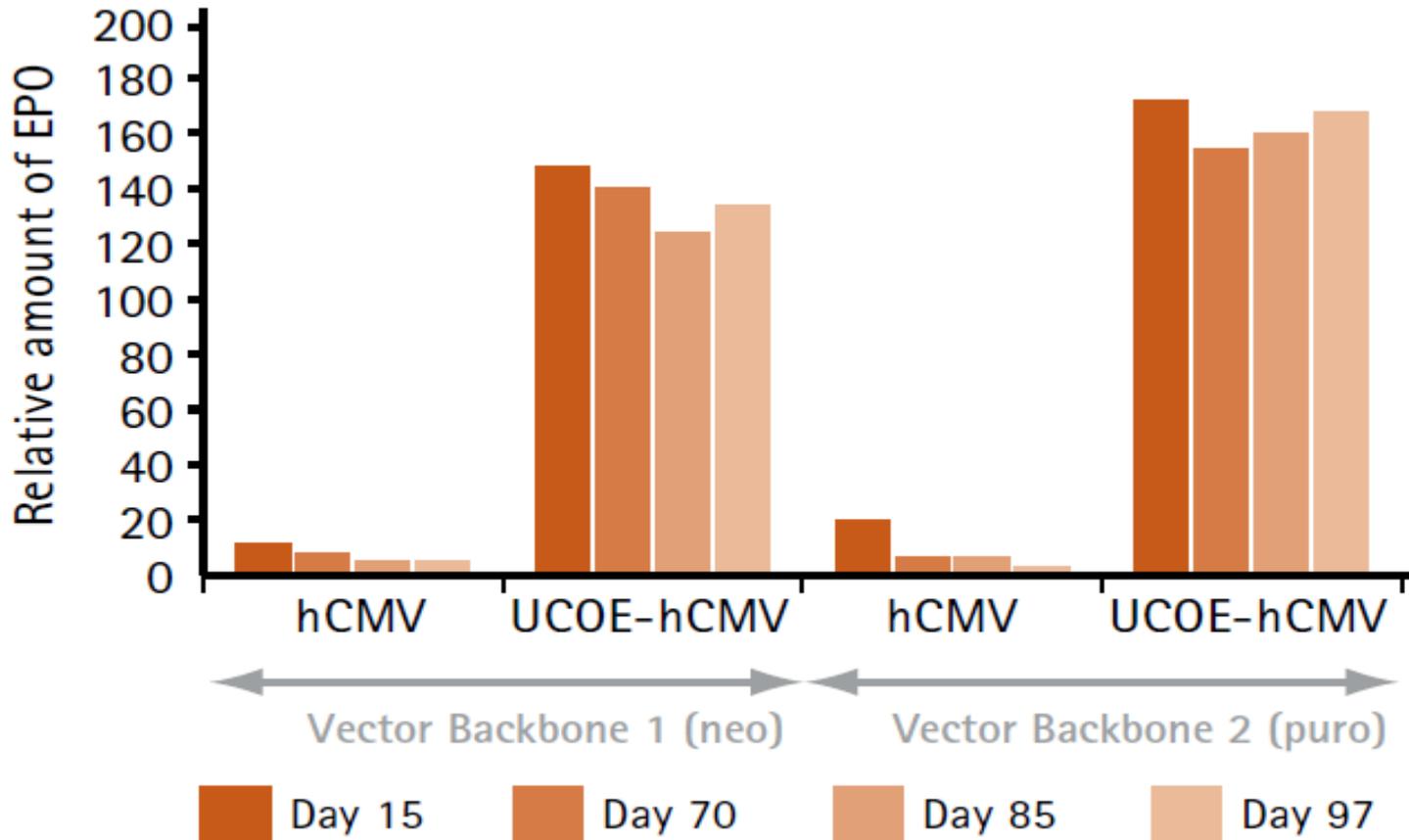


UCOE Hu-P sequence landmarks

Murine phosphoglycerate kinase (PGK) promoter	5646-6156
Puromycin coding region	6170-6746
Complement Component 2 (C2) poly A	6825-7082
β-lactamase (Amp) promoter	7188-7433
β-lactamase coding region (Amp)	7434-8291
Origin of replication (ori) (pMB1)	8511-9135
UCOE (4kb)	130-4200
Guinea Pig CMV promoter	4389-5184
Multiple Cloning Region (MCR)	5309-5316
SV40 poly A	5405-5630

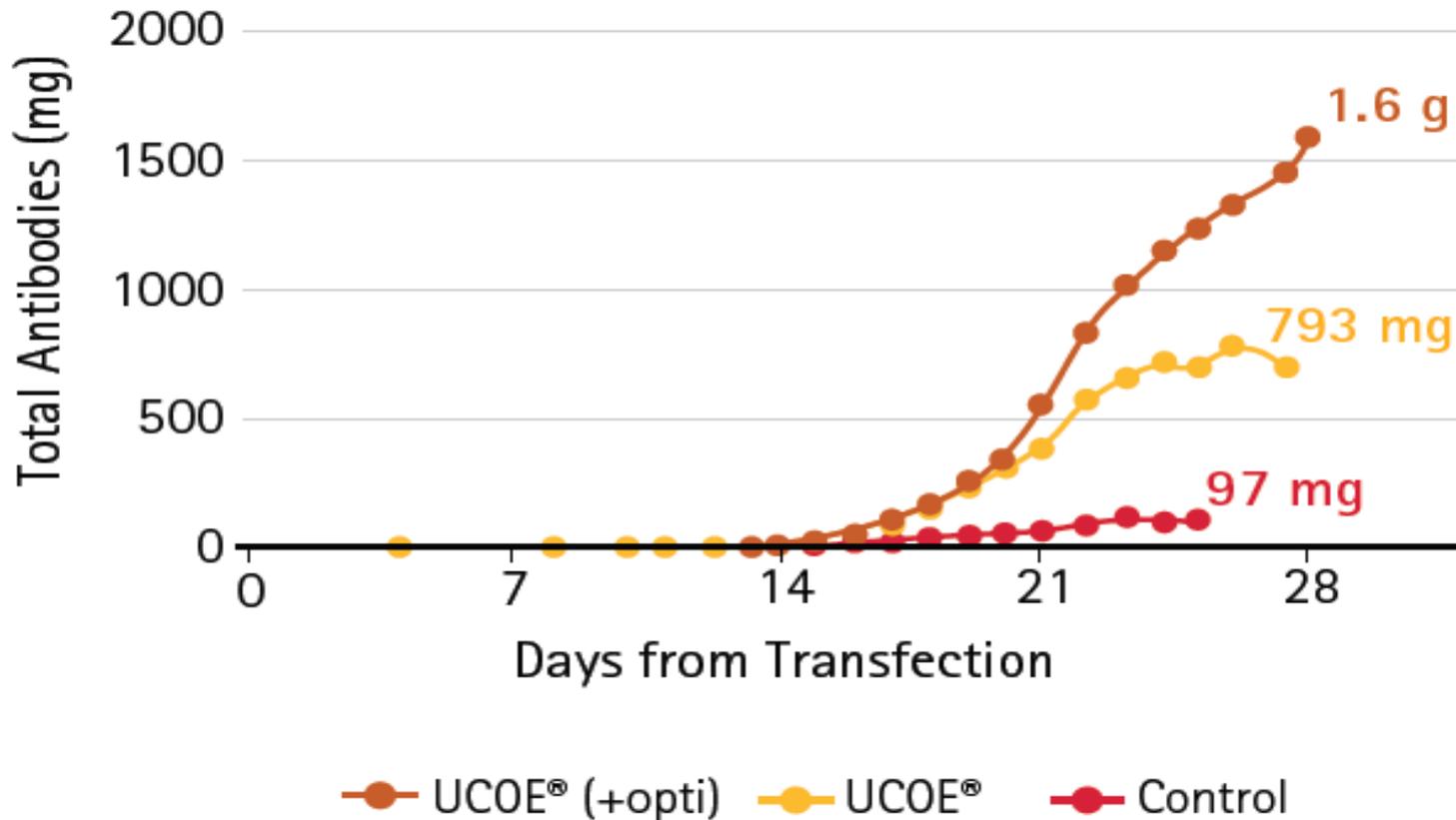


UCOE[®] 表达效果：目的蛋白产量大幅提高



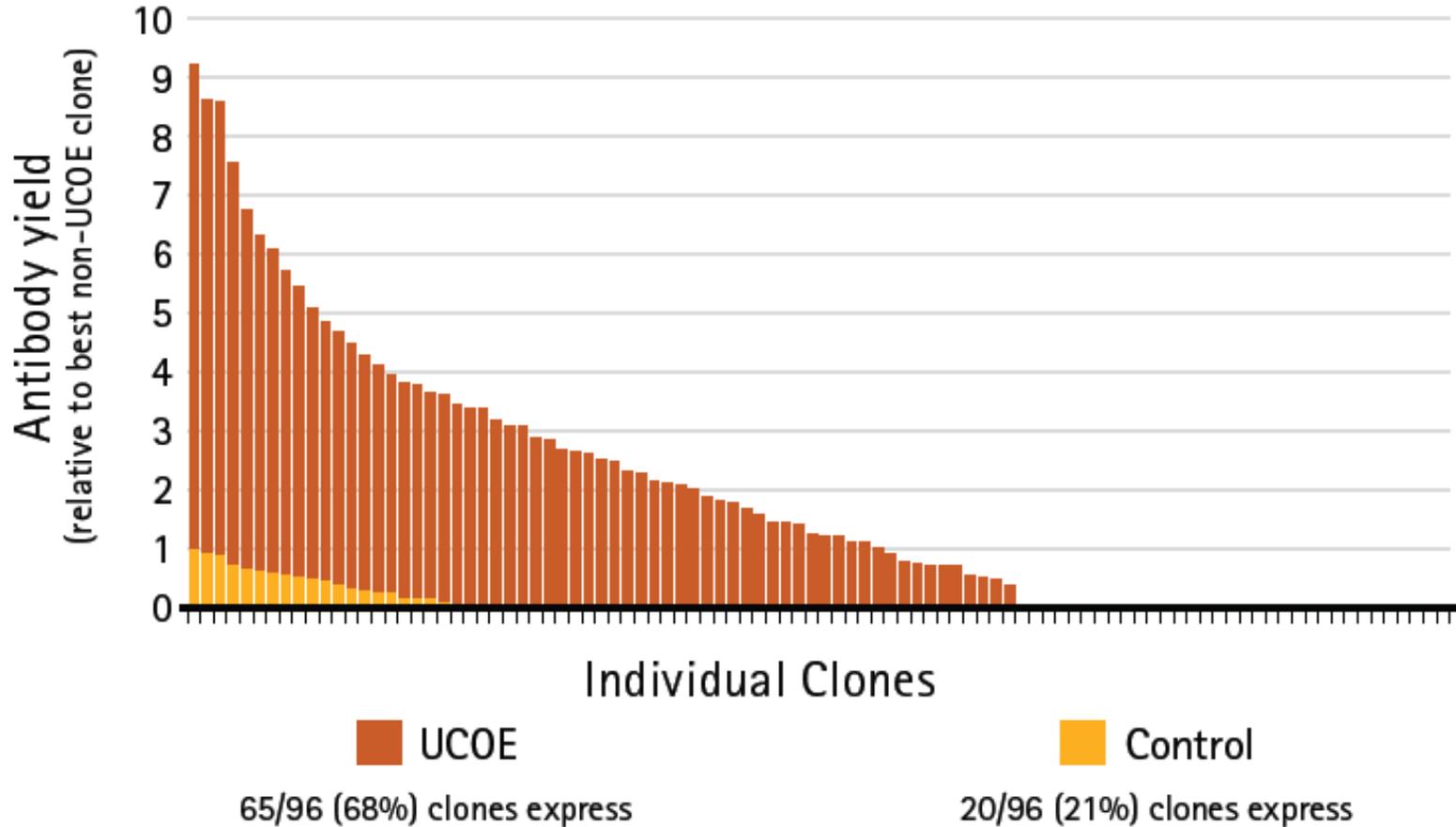
UCOE[®]表达技术将分泌型EPO蛋白产量提高9-56倍。 在外源基因启动子5'端上游加上一个UCOE[®]元件，即获得了20倍以上的产量提高。CHO-K1细胞经转染和抗生素筛选、培养，评估克隆产量。

UCOE[®] 表达效果：更短的时间，更高的产量



快速生产单克隆抗体： 3×10^7 CHO-S细胞转染90 μ g抗体表达质粒。经抗生素筛选，培养并放大到10L。在第16天添加少量新鲜培养物（+opti）。经评估，带UCOE[®]元件的表达质粒抗体产量得到显著提高。

UCOE[®] 表达效果：更便于发现高产克隆



因为多数细胞均表现稳定高产，采用UCOE[®]技术相对于传统的大海捞针式的筛选高产克隆显得简便多了。两个载体分别带有抗体的重链和轻链基因，共转染CHO-S细胞，经抗生素筛选，随机选取96个克隆进行抗体产量评估。

已经用UCOE[®]成功表达的蛋白种类及宿主细胞

- 促红细胞生成素 (EPO)
- 抗体 (摇瓶& 生物反应器) ,
人源化anti-hu MUC1 Ab
(huHMFG1)-human DNase I
- 活性蛋白/酶：凝血因子，激酶，多肽，还原酶，转移酶，氧化酶
- 细胞因子，融合分子
- 膜结合蛋白，GPCRs

CHO (Chinese Hamster Ovary)

- CHO-K1
- CHO-S
- CHO-DG44
- CHO-DXB11

V79 (Chinese hamster lung)

BHK21 (Syrian hamster kidney)

NS0 (Mouse B cell)

293 (Human embryonic kidney)*

Hela (Human cervical adenocarcinoma)

MEL c88 (Mouse erythroleukemia)

COS-7 (Monkey kidney fibroblast)**

Hep G2 (Human hepatocellular carcinoma)

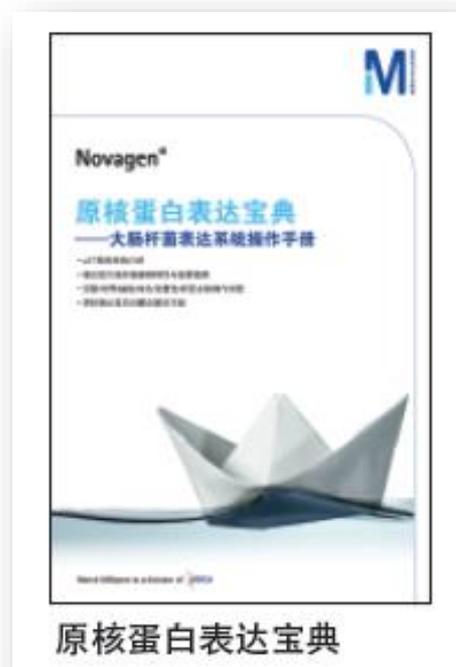
Jurkat (Human T cell)

3T3 (Mouse embryonic fibroblast)

PC-3 (Human prostate adenocarcinoma)

默克密理博重组蛋白制备提供：

- 表达载体
- 宿主细胞
- 培养基
- 抽提试剂
- 纯化试剂/试剂盒
- 浓缩除盐换液
- 细胞培养与计数
- 高通量策略/工具



一次性除菌澄清过滤装置



真空



Steriflip
50ml



Steri-top/cup
150-1000ml



Stericap PLUS
10L



压力



Millex
1-200ml



Sterivex
1-2L



Steripak
10-20L

Merck Millipore 超滤装置



Amicon Ultra 0.5



Amicon Ultra 2



Amicon Ultra 4



Amicon Ultra 15



Centricon Plus-70



Ultrafree MC/CL



Stirred Cell



**Solvent-Resistant
Stirred Cells**

不同通量，不同的操作策略

细胞裂解/抽提

纯化

浓缩/除盐/换液

低通量——精细制备（一至几个样品）

BugBuster®,
YeastBuster™,
CytoBuster™

亲和树脂（His•Tag, GST•Tag, S•Tag,
T7•Tag, Strep•Tag, Protein A, Protein
G, Protein A/G, 链亲和素）

+

Amicon® Pro 纯化浓缩系统
或者重力流柱

Amicon® Pro 纯化超滤管
D-tube™ 透析管
Amicon® Ultra 超滤管

中通量——兼顾效果和效率（几个至几十个样品）

BugBuster®,
YeastBuster™,
CytoBuster™
或者
PopCulture®
Insect PopCulture®

亲和树脂（His•Tag, GST•Tag, S•Tag,
T7•Tag, Strep•Tag, Protein A, Protein
G, Protein A/G, 链亲和素）

+

Amicon® Pro 纯化浓缩系统

Amicon® Pro 纯化超滤管
D-tube™ 透析管
Amicon® Ultra 超滤管

PureProteome™ 磁珠（His•Tag, Protein
A, Protein G, Protein A/G, 链亲和素）

+

磁力板
或者磁力架

高通量——快速、方便的制备（几十个至更多样品）

PopCulture®
Insect PopCulture®
+
MultiScreen® 深孔板

PureProteome™ 磁珠（His•Tag, Protein
A, Protein G, Protein A/G, 链亲和素）

+

磁力板
或者自动化工作站

D-tube™ 96 孔透析板
MultiScreen® 超滤板

亲和树脂（His•Tag, GST•Tag, S•Tag,
T7•Tag, Strep•Tag, Protein A, Protein
G, Protein A/G链亲和素）

+

MultiScreen® 多孔板 +
manifold 真空抽滤装置 + 真
空压力泵
或者自动化工作站

针对高通量操作，默克密理博还提供：

- LIC 快速表达克隆试剂盒
- 96 孔板感受态细胞
- 铺板珠
- Overnight Express™ 自动诱导培养基（大肠杆菌发酵）
- His•Tag 抗体板
- 大肠杆菌、昆虫细胞、哺乳动物细胞表达系统相关产品



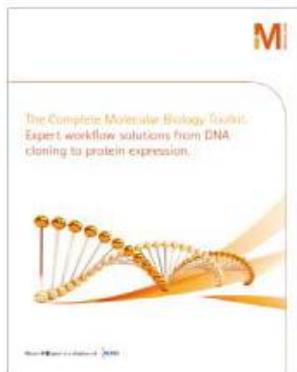
PRO Mart

Protein Research Online

您的蛋白研究工具超市

先进的技术与高品质产品全展示:

- ✓ 蛋白表达、纯化、复性与分析
- ✓ 蛋白分级抽提富集
- ✓ 蛋白互作与功能研究
- ✓ Western Blot技术与产品



从克隆到表达产品手册



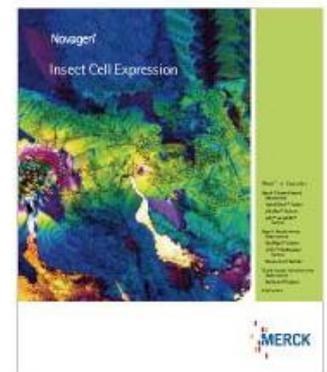
pET系统挂图
(载体-宿主菌-蛋白抽提-
纯化-去除标签)



原核蛋白表达宝典



增强原核表达蛋白可溶性
技术手册



昆虫细胞蛋白表达技术手册



Thank you for your attention!