

重组蛋白使用说明

Instructions For Using Recombinant Protein

感谢您选择 TargetMol® 的重组蛋白 (Recombinant Protein)。

以下有关产品的相关信息,供您参考:

1 重组蛋白产品是如何运输的?

大部分重组蛋白产品为冻干粉,对温度不敏感,在室温下稳定,一般室温或蓝冰运输。对于液体类蛋白,一般采用干冰运输。如果您收到产品时发现冰盒已经融化,无需担心,蛋白可以正常使用,短时间内不会影响产品质量。如果特定蛋白在室温下不稳定,我们会提供相应的低温运输方式,以确保产品质量不受影响。

2 重组蛋白产品该如何保存?

1) 存储条件: 重组蛋白产品收到后,如不立即使用,应当保存在 -20 °C 至 -80 °C 的条件下,冻干粉可稳定保存 12 个月以上,液体类产品在 -80 °C 条件下可保存 6-12 个月。已复溶的重组蛋白样品需尽快用完,如果您的实验不能在一周内用完,需在 -20 °C 至 -80 °C 保存,可保存 3 个月以上。

2) 避免反复融冻: 重组蛋白产品需注意避免反复冻融,建议将重组蛋白产品分装成多份。分装冻存时,建议选择含有一定浓度载体蛋白的溶液或培养基复溶产品,需要注意的是,产品浓度不低于 100 µg/mL,且每管的体积不小于 20 µL。

3 为什么某些重组蛋白溶液中需要载体蛋白?

载体蛋白通常被用于提高蛋白的稳定性,防止蛋白在冷冻或解冻过程中粘附在管壁上。塑料管对蛋白有一定的吸附能力,这可能导致蛋白和管壁之间难以分离,导致溶液中蛋白的实际浓度下降,从而影响其活性。为减少这种损失,在长期保存重组蛋白产品之前,建议添加常用的载体蛋白溶液,例如 0.1% BSA (牛血清白蛋白)、5% HSA (人血清白蛋白)、10% FBS (胎牛血清) 或 5% 海藻糖等。如果重组蛋白的浓度较低,强烈建议添加适量的载体蛋白。

4 重组蛋白产品如何复溶?

不同产品需要使用不同的溶剂进行复溶,大多数蛋白只需添加无菌蒸馏水来进行复溶,但少数产品可能需要其他处理。为确保正确的复溶过程,请根据产品手册中的说明选择适当的溶剂。

1) 打开盖子后,样品为暴露状态,应迅速向冻干粉中加入指定的复溶缓冲液。轻柔颠倒数次,避免剧烈振荡。

*如您收到的是离心管,打开盖子之前,请先使用 10000-12000 rpm 的转速进行离心 20-30 秒,将附着在管盖或管壁上的冻干粉收集到管底。

2) 复溶后的样品需要在室温下静置数分钟,确保蛋白充分溶解。

3) 对于较难溶解的含甘油类产品,冻干后一般呈粘稠状贴在管壁上,建议在加入复溶缓冲液后,用移液器吸取复溶液,反复冲洗管壁上的样品,冲洗下来后轻轻晃动样品,直到样品澄清为止。此过程也需轻柔操作,避免剧烈振荡。

4) 复溶后的蛋白即可进行实验或分装储存。如果您进行的是短期实验,可将蛋白溶液保存在 2-8 °C,请在一周内用完;如果您需要长期储存,建议添加载体蛋白或一定浓度的培养基,分装后存储在 -20 °C 至 -80 °C。若实验需求无血清,可以使用 5% 海藻糖溶液作为载体。

5 为什么肉眼看到的重组蛋白体积与预期不符?

蛋白冻干粉由蛋白原液冻干而来,冻干粉质量不等同于蛋白质量。冻干产品的体积大小受多种因素影响,包括冻干前缓冲液的组分、盐离子浓度以及产品本身的浓度等。所以冻干粉可能看上去很多,也可能肉眼不易观察到,这些都是正常现象,请您放心使用。在收到产品后,照常复溶、使用或分装储存即可。

6 重组蛋白是如何进行质检的?

纯度: **1) SDS-PAGE 测定法** **2) HPLC 测定法** **3) 银染测定法**

浓度: **1) Bradford 蛋白定量测定法** **2) BCA 蛋白定量测定法** **3) SDS-PAGE 蛋白定量测定法**

7 重组蛋白 ED₅₀ 值是否有批间差?

重组蛋白的 ED₅₀ 值可能会在不同批次或使用不同实验方法时有所差异,在 COA 中测得的 ED₅₀ 值不一定适用于每个特定实验条件。如果您的实验与我们公司测试的实验方法不同,我们建议您根据实际测试情况来获得最合适实验条件的 ED₅₀ 值。

8 如何计算重组蛋白的活力值?

ED₅₀, 即半数有效量,是指在反应中能引起 50% 最大反应强度的药量,在蛋白活性反应中表示引起 50% 最大反应所用的蛋白浓度。我们通常通过测定 ED₅₀ 值来测量重组蛋白的生物活性,通常以 ng/mL 为单位。其计算公式如右:

$$\frac{\text{units}}{\text{mg}} = \frac{1 \times 10^6}{\text{ED}_{50}(\text{ng/mL})}$$

需要注意的是,以上计算公式并不适用于“国际单位 (IU)”和“ED₅₀”之间的转换关系。

9 重组蛋白常见的种属有哪些?

| | | | | |
|------------|------------|-------------|-----------------------|-------------|
| 人 (Human) | 牛 (Bovine) | 猪 (Porcine) | 猴 (Rhesus Macaque) | 病毒 (Virus) |
| 小鼠 (Mouse) | 兔 (Rabbit) | 狗 (Canine) | 猕猴 (Cynomolgus) | 其他 (Others) |
| 大鼠 (Rat) | 羊 (Sheep) | 猫 (Feline) | 非洲爪蟾 (Xenopus laevis) | |

10 重组蛋白是否有种属交叉活性?

不同种属的重组蛋白在其交叉活性方面表现出差异。大多数的人源细胞因子对小鼠细胞有效,鼠源细胞因子也对人细胞有效,但其特异性不强。如成纤维细胞生长因子 (FGFs)、神经营养因子 (如 BDNF、GDNF、CNTF、β-NGF 等)、转化生长因子-β (TGF-β) 等具有高度保守性,在各种种属间具有较强的交叉活性。

然而,有些细胞因子具有种属特异性,如干扰素、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、白细胞介素-3 (IL-3)、白细胞介素-4 (IL-4) 等。针对特定种属的这些因子,它们可能仅对相应种属的细胞产生预期的生物学效应。

因此,建议在实验和应用中尽量选择对应种属的重组蛋白,以确保更准确和有效地实现预期的生物学效应。

11 重组蛋白有哪些表达系统?有什么不同?

重组蛋白表达体系主要分为原核表达系统和真核表达系统。

1) 原核表达系统: 主要包括有大肠杆菌表达系统、芽孢杆菌表达系统、链霉菌表达系统,其中最常用的表达系统是大肠杆菌表达系统。原核表达系统具有经济、快速和高产量的优点,应用广泛,但不具备翻译后修饰,不适用于大分子蛋白表达,且易形成包涵体。

2) 真核表达系统: 主要包括哺乳动物细胞表达系统、酵母表达系统和昆虫细胞表达系统。

哺乳动物细胞表达系统: 当含有复杂二硫键或翻译后修饰的靶蛋白不能使用其他表达系统表达时,哺乳动物细胞可表达外源蛋白。常用的蛋白表达的哺乳动物细胞系包括 HeLa 细胞、人胚肾细胞 (HEK293) 和中国仓鼠卵巢巢细胞 (CHO)。哺乳动物细胞表达系统具有更低内毒素、更好的活性和更好的翻译后修饰,可进行瞬时转染或稳定转染表达,但是高表达细胞株所需时间长,规模培养的成本高。

酵母表达系统: 常用的有外源蛋白表达的酵母菌株包括酿酒酵母、粟酒裂殖酵母、毕赤酵母和乳酸克鲁维酵母。酵母表达系统经济、快速、高产量,可进行部分翻译修饰,但其糖基化方式为甘露聚糖型,与哺乳细胞不同。

昆虫细胞表达系统: 膜蛋白、大分子质量蛋白和蛋白激酶这些很难用细菌表达系统表达的蛋白,在 Sf9 或 High-5 等昆虫细胞中实现了表达。昆虫细胞表达系统基因容量大,适用于毒性蛋白表达,具有类似哺乳动物系统的特性,且载体构建周期短,可翻译后修饰,但缺少部分糖基化,存在 BEVS 中重组蛋白易降解的问题。

12 如何选择合适的重组蛋白表达体系?

如果您想用作抗原来获得特异性抗体进行检测,不需要天然活性或蛋白修饰,可以选择原核表达系统。

如果您计划进行蛋白质结晶及晶体结构研究,需要纯度较高的重组蛋白,建议您使用原核表达体系,昆虫/哺乳动物细胞表达体系也可作为备选。

如果您的目标是进行蛋白的功能研究,需要保存蛋白的天然活性,请根据您的需求选择原核或真核表达体系。

如果您打算用于药物研究的蛋白质,需要尽量保存序列,具有天然活性,真核表达系统可能是更好的选择。

除了应用需求之外,您还可以结合蛋白的性质、实验周期和成本、需要的蛋白量以及实验规模等选择合适的表达系统。

13 不同标签对重组蛋白有什么影响?

不同的蛋白标签可能会对重组蛋白产生一些影响,而选择标签通常取决于研究需求和最终应用。

1) 小分子量的融合肽: 如 His、Flag、Myc 等,此类标签分子量较小,通常不会影响目的蛋白的性质和功能,便于蛋白的纯化、检测和示踪。

2) 大分子量增溶性融合蛋白: 如 GST、Sumo、MBP 等,这类标签通常会增强目的蛋白的可溶性,保护重组蛋白免受胞外蛋白酶的降解并提高蛋白的稳定性。但这些标签可能会影响蛋白的结构和功能,因此在功能研究中需要谨慎考虑。

3) 报告性融合蛋白: 如 eGFP、eYFP、eCFP 等,这类标签具有自发荧光,可以用于实时监测蛋白的定位、表达水平和运动。适用于细胞内蛋白的功能定位、迁移变化、基因表达调控等研究。但在某些情况下可能会对蛋白的结构和稳定性产生微小的影响。例如荧光标签可能会在晶体生长过程中引入一些干扰因素,因此对于蛋白的晶体学研究,需要谨慎选择荧光标签。