

重组蛋白使用须知

A 重组蛋白分类

1 按蛋白分类

- 1.1 细胞因子和生长因子 (Cytokines/Growth Factors)
- 1.2 免疫检查点蛋白 (Immune Checkpoint Proteins)
- 1.3 CAR-T相关蛋白 (CAR-T Related Proteins)
- 1.4 CD抗原 (CD Antigens)
- 1.5 Fc受体蛋白 (Fc Receptor Proteins)
- 1.6 受体蛋白 (Receptor Proteins)
- 1.7 酶&调节子 (Enzymes & Regulators)
- 1.8 补体系统 (Complement System)
- 1.9 泛素相关蛋白 (Ubiquitin Related Proteins)
- 1.10 病毒蛋白 (Viral Proteins)
- 1.11 生物素标记蛋白 (Biotinylated Proteins)
- 1.12 荧光标记蛋白 (Fluorescent-labeled Proteins)
- 1.13 GMP级蛋白 (GMP-grade Proteins)
- 1.14 其他 (Others)

2 按种属分类

- 2.1 人 (Human)
- 2.2 小鼠 (Mouse)
- 2.3 大鼠 (Rat)
- 2.4 猴 (Rhesus Macaque)
- 2.5 猕猴 (Cynomolgus)
- 2.6 猪 (Porcine)
- 2.7 狗 (Canine)
- 2.8 牛 (Bovine)
- 2.9 羊 (Sheep)
- 2.10 兔 (Rabbit)
- 2.11 猫 (Cat)
- 2.12 病毒 (Virus)
- 2.13 非洲爪蟾 (Xenopus laevis)
- 2.14 其他 (Others)

B 重组蛋白的研究分类

研究目的	最适表达系统	蛋白要求
用作抗原, 获得特异性抗体用于检测	原核表达体系	纯度 > 80%, 不需要蛋白修饰或天然活性, 可带标签
蛋白质结晶及晶体结构研究	2/3 是原核表达体系, 1/3 是昆虫细胞表达体系与哺乳动物细胞表达体系	纯度 > 95%, 浓度通常在10mg/mL
蛋白的功能研究	原核表达体系和真核表达体系	需要保存蛋白的天然活性
用于药物研究的蛋白质	真核表达体系	一般要求尽量保存天然序列, 具有天然活性

C 重组蛋白表达体系

表达体系	特性
原核	繁殖快、成本低, 产量高, 但不能进行糖基化修饰, 常为包涵体
酵母	易操作, 蛋白背景弱, 适合大规模生产, 便于纯化, 但存在产量不高以及糖基化达不到要求等问题
昆虫细胞	功能与天然蛋白相似, 对于部分有毒性或较难表达蛋白有优势, 但糖基化程度低, 形式比较单一, 活性不如哺乳动物细胞体系
哺乳动物细胞	结构与天然蛋白最接近, 完善的翻译后加工, 活性更好, 但表达水平较低, 周期长, 技术要求高

D 无动物成分

BETAGENE的重组蛋白均为无动物成分 (Animal-Free)。Animal-Free是指在独立的、无动物成分的生产车间中生产出来的, 其生产过程中未使用任何动物来源的材料 (例如胰蛋白酶等任何含动物成分的培养基或试剂), 因此可保证最终的重组蛋白中不含任何动物成分, 非常适合于临床前试验和动物研究。

重组蛋白通常是用细菌表达, 而细菌培养基中需要添加胰蛋白胍 (Trypton) 等动物来源的组分, 这些组分不可避免地导致不明的动物成分在终端产品中残留。虽然终端产品纯度可达98%或99%以上, 其残留的杂质很可能就包含胰蛋白胍的动物成分。这些含量极微的成分会导致其中所含动物病原体 (如疯牛病毒及其它未知病原体) 传染给人和动物。另外, 这些动物成分中的异源蛋白也会引起人和动物的异体排斥或过敏反应。因此, 当重组蛋白在应用过程中可能接触到人体或动物体时 (如细胞治疗和动物体内实验等), 请尽量选用Animal-Free的重组蛋白。

G 蛋白标签

蛋白标签 (Tag) 指重组蛋白制备过程中与目的蛋白融合表达的蛋白或多肽。BETAGENE的重组蛋白产品大部分为Tag-Free, 但少数重组蛋白产品因为不同目的需要加有标签。

1. 标签利于蛋白纯化;
2. 当目的蛋白无特定抗体直接鉴定, 可利用标签进行Western Blot或ELISA分析方法鉴定;
3. Fc标签可以提升重组蛋白的半衰期以提高分子的稳定性, 同时也能够促进重组蛋白形成活性二聚体。

重组蛋白标签对蛋白的生物学活性影响存在未知结论, 但对大部分检测应用中, 重组蛋白的标签对蛋白本身生物学活性并无影响, 所以无需移除。BETAGENE对重组蛋白产品都已经做过生物学活性检测并将数据公示于COA中。

重组蛋白使用须知

H 冻干产品使用前注意事项

冻干粉产品在运输过程中会有粉末黏在管壁或盖上，使用前请勿开盖并离心处理20-30秒（高速离心机，约13000 rpm），使附于管盖或管壁的蛋白收集于管底。亦可使用最高转速为4000-4500rpm的离心机离心5分钟（3000-3500rpm），也能达到类似的效果。虽然有时管中蛋白粉末不可见或者可视数量很少，我们的质控体系保证每管中所含的蛋白量是准确且足量的。

I 产品的溶解（Reconstitution）

1. 使用前准备：

使用前先离心（见上文），使附于管盖或管壁的蛋白沉于管底；

2. 溶解液：

2.1 要求用无菌去离子水溶解的产品，务必不可用盐溶液，避免过高的盐浓度造成蛋白不可逆的析出；不可用PBS或培养液（1640或DMEM等）直接溶解，否则蛋白可能无法完全溶解，从而导致蛋白活性不足或失活；

2.2 要求用盐溶液溶解的产品，请依照说明书上的浓度，同样也是为了避免过高的盐浓度；

2.3 同个产品不同批次的溶解方法可能有所不同，可联系我们的技术支持获得帮助。

3. 溶解到指定的浓度：

3.1 我们建议最佳浓度一般不低于100 µg/mL，如10µg的冻干粉，则加入10µL-100 µL的溶解液；

3.2 高于或低于最佳浓度，细胞因子可能会不稳定，或者聚集（aggregation），导致部分蛋白沉淀，影响其活性。高于这个浓度范围，可能会超过该蛋白的最大溶解浓度，即蛋白无法完全溶解；

3.2 用移液枪轻吹混匀，或将管盖盖好后轻柔颠倒数次进行混匀，低速离心数秒；溶解时不可振荡（vortex，即用涡旋仪进行快速振荡），避免因化学键的断裂造成蛋白失活；

3.3. 将溶解后的蛋白在室温放置数分钟，以保证蛋白能够充分溶解。建议将不易溶解（slow to dissolve）的蛋白用低速摇床促进其溶解。

4. 溶解后的保存：

不建议用推荐的溶解液做进一步稀释。溶液中的蛋白很容易黏附在冻存管壁，且很难与管壁分离。使用含有载体蛋白的溶液（该溶液通常是指pH近中性，有一定缓冲能力的缓冲液，如PBS，培养液等）预先封闭塑料管壁上的蛋白结合位点，使细胞因子或重组蛋白不会黏于管壁，方可更好地保存蛋白溶液；

5.1 短期保存：在一般情况下，上文中建议的浓度是较高的。我们建议将该溶液用含载体蛋白（如0.1% BSA、10% FBS、5% HSA）的溶液进行稀释，分装存于4°C并于一周内用完，分装体积不要小于20µL。否则稀释后的细胞因子或重组蛋白很容易会粘附在管壁或瓶壁上，使得溶液中的细胞因子或重组蛋白的浓度下降，从而影响其生物活性；

5.2 长期保存：若配置的溶液无法一次用完，我们建议用含载体蛋白（如0.1% BSA、10% FBS、5% HSA）的溶液进一步稀释，分装冻存于-20°C-80°C，分装体积不要小于20µL；

5.3 在做无血清培养或动物的体内实验时，细胞因子中不能含有BSA，FBS或HSA等动物或人的成分，我们建议选用BETAGENE小包装产品，每次使用一支，用后即废弃。或者用含5%海藻糖（Trehalose）的溶液来稀释已溶解的细胞因子或重组蛋白，然后分装冻存，分装体积不要小于20µL。

J 重组蛋白的种属交叉活性

重组蛋白的种属交叉活性需要根据具体产品而定；建议尽量选择对应种属的重组蛋白。如实在无法匹配种属，以下信息仅供参考：

1. 大多数人细胞因子对小鼠细胞有效（仅少数例外，见c）；
2. 多数小鼠细胞因子对人细胞有效，但特异性可能不强。例如小鼠的表皮生长因子（EGF）对人的表皮细胞有活性，对人的其他种类细胞可能也有作用；
3. 干扰素、GM-CSF、IL-3、IL-4具有种属特异性，即这类重组人细胞因子只能作用于人细胞，对小鼠和大鼠等异种无效，这类重组小鼠细胞因子也仅用于小鼠细胞，对人细胞无效；
4. 成纤维细胞生长因子（FGFs）、神经营养因子（Neurotrophins，如BDNF、GDNF、CNTF、β-NGF等）、TGF-β等高度保守，各种属间交叉活性强；
5. 请致电我们的400电话或联系我们的技术支持获得帮助。

K 重组蛋白的储存及运输

由于每次冻融都会造成蛋白的部分失活，收到产品后适量分装，请避免反复冻融。溶解后如需更久地保存产品，请参考『产品的溶解』部分。

1. 短期储存：

1.1 冻干粉产品比较稳定，室温下可存放3周，不影响活性。大于大多数蛋白，溶解后在4°C仅能短暂地保存1-2周；

1.2 溶液产品（如胰蛋白酶、核酸酶）已搭配了合适的缓冲液，须存放于-20°C。

2. 长期储存：

2.1 自产品收到之日算起，冻干粉产品在-20°C至-80°C可稳定储存2年。且每管的体积不小于20µL，在-20°C至-80°C条件下可保存3-6个月。

2.2 溶液产品已搭配了合适的缓冲液，在-20°C至-80°C可稳定储存1年；

c. 运输：

BETAGENE的大部分重组蛋白产品为冻干粉，在室温环境中都是稳定的，一般采用蓝冰或者室温运输。胰蛋白酶液体采用干冰运输。

L 细胞因子或蛋白的外观

BETAGENE重组蛋白产品中均不含载体蛋白或其它添加物（如BSA、HSA等），且以最低含量的溶液进行冻干并沉积于冻存管内，因此冻干后的蛋白并非是显眼或厚重的白色干粉，甚至黏附在管壁管盖上。虽然蛋白层很薄或者肉眼不可见，我们的生产及质控确保每管中所含的蛋白量是符合COA及其标识的。我们建议收到产品后按照上文『H 使用前注意事项』操作。

重组蛋白使用须知

M 产品的检测

- 1. 基因序列:** 经N端序列分析。必要时, 使用SDS-PAGE, HPLC和质谱分析等方法与标准品进行比对;
- 2. 蛋白纯度:**
 - 2.1 经SDS-PAGE
 - 2.2 HPLC分析
- 3. 生物活性:** 经相关的体外或体内生物活性检测, 详见下文;
- 4. 蛋白含量:**
 - 4.1 紫外分光光度
 - 4.2 BCA蛋白定量测定
 - 4.2 SDS-PAGE分析
 - 4.4 HPLC法与标准品比对
- 5. 内毒素含量:** 经动态LAL (西方萤试剂) 法或TAL (东方萤试剂) 法测定;
- 6. 无菌:** 所有蛋白溶液在分装冻干前经0.22um滤膜过滤除菌, 在B+A级环境分装、冻干及封盖;
- 7. 分子量:** SDS-PAGE分析;
- 8. 宿主蛋白残留:** 荧光染色;
- 9. 宿主DNA残留:** ELISA试剂盒;
- 10. 支原体检测:** 支原体试剂盒。

J 重组蛋白的共线生产

我们设立了严格的质量体系, 按照国家药品监督管理局发布的《药品共线生产质量管理指南》规范管理产品的生产, 最大程度降低甚至杜绝共线生产导致的产品间的污染、交叉污染, 保证产品的安全、有效和质量可控, 确保客户安全地使用我们的产品。

N 生物活性 (Specific Activity)

1. ED₅₀的计算:

BETAGENE的蛋白产品ED₅₀ (即半数有效浓度, 其定义是对特定细胞引起50%最大反应的蛋白浓度, ng/mL) 可在COA中获取, 这种活性表示法仅适用于剂量反应曲线呈S形的细胞因子。将1 ng/mL ED₅₀定义为1 unit, 则产品生物学活性Specific Activity的换算公式如下:

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

以上计算公式并不适用于International Units (IU) 和ED₅₀的换算关系, 我们建议采用国际标准品对比相同实验获得该蛋白的IU值。

2. 影响ED₅₀的因素:

产品说明书中的实验方案只是确认该产品的ED₅₀, 如果客户的实验类型与我们相同, 则可以按照产品标定的生物活性进行实验; 若实验采用了不同的细胞种类或方法, 我们建议客户按照梯度浓度通过实验获得最佳ED₅₀值, 并依据此数值制定相应的实验方案以及产品的添加量。如对生物活性或实验方法有疑问, 可联系我们的技术支持。



BETAGENE GENETIC Inc.

4009 - 204 - 254

86 (21) - 58593289

商务合作: BD@betagene.com

售后支持: SUPPORT@betagene.com

www.betagene.com

BETAGENE贝融生物

