



钟鼎生物
ZONBIO BIOTECHNOLOGY

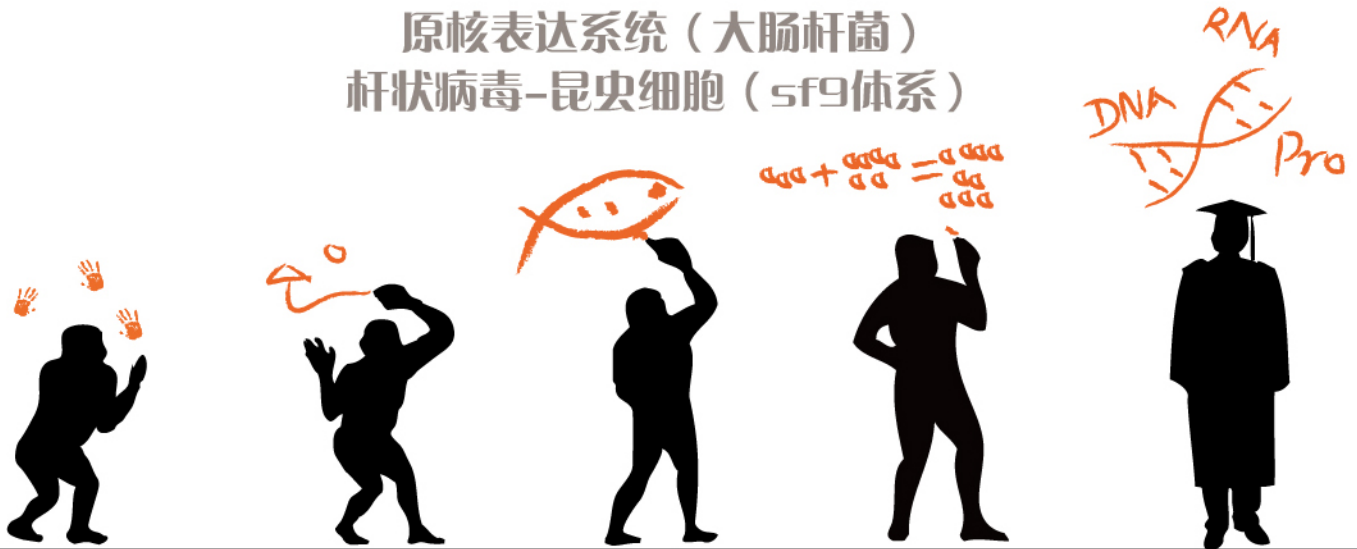
蛋白表达服务系列

哺乳动物细胞表达系统

酵母细胞（毕赤酵母）

原核表达系统（大肠杆菌）

杆状病毒-昆虫细胞（sf9体系）



公司名称：南京钟鼎生物技术有限公司
分子生物学技术服务 025-84448440-601
基因工程操作技术服务 025-84448440-608
免疫学检测技术服务 025-84448440-602
项目合作 025-84448440-601
传真：025-84448440-609

免费热线：400-025-1124
抗体制备技术服务 025-84448440-611
蛋白表达技术服务 025-84448440-608
蛋白质解析服务 025-84448440-608
行政外联 025-84448440-606

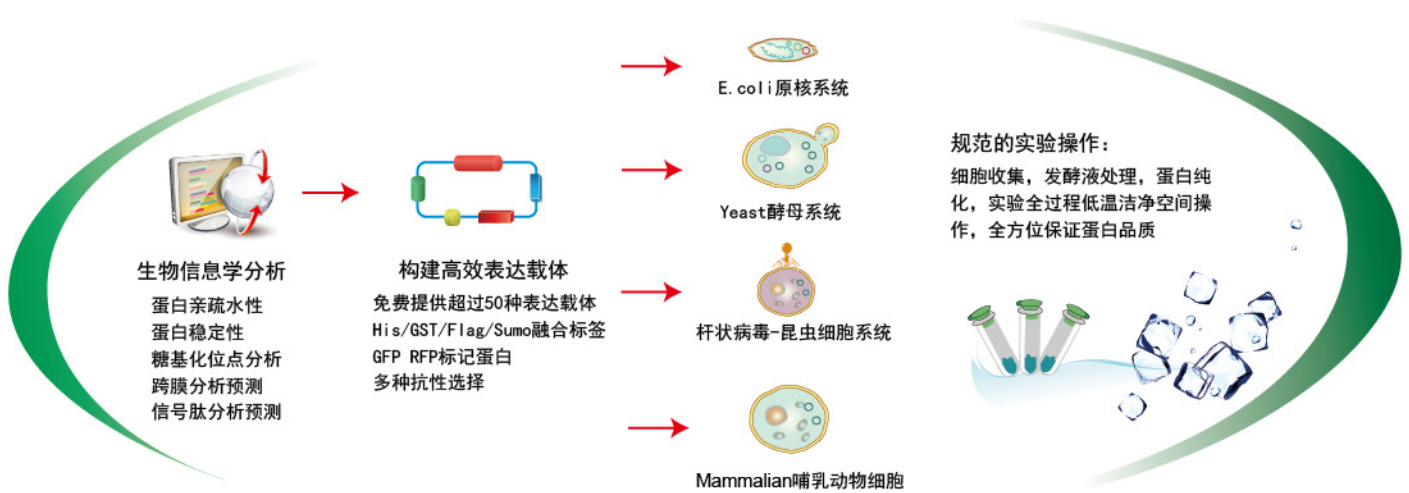
邮箱：order@zoonbio.com 公司网址：www.zoonbio.com

联系地址：江苏省南京市玄武区孝陵卫双拜巷78号紫金山创业科技园A座2楼（邮编 210014）

重组蛋白表达服务概述

蛋白表达是现代工业、医疗和基础研究领域的重要组成部分，也是当前生物技术的难点和热点，我们拥有经验丰富的专家团队，成功为国内外制药企业和科研院所表达了数百种蛋白，建立起了稳固的蛋白表达技术体系，目前我们可以提供原核蛋白表达，酵母蛋白表达，杆状病毒-昆虫细胞以及哺乳动物细胞瞬时表达。

- » 原核蛋白表达系统以大肠杆菌表达系统为代表，具有遗传背景清楚、成本低、表达量高和表达产物分离纯化相对简单等优点，缺点主要是蛋白质翻译后缺乏加工机制，如二硫键的形成、蛋白糖基化和正确折叠，得到具有生物活性的蛋白的几率偏小。
- » 酵母蛋白表达系统以甲醇酵母为代表，具有表达量高，可诱导，糖基化机制接近高等真核生物，分泌蛋白易纯化，易实现高密发酵等优点。缺点为部分蛋白产物易降解，表达量不可控。
- » 杆状病毒-昆虫细胞表达系统凭借高特异性高表达水平及翻译后修饰功能，被用作一种表达大规模蛋白的强有力的工具系统，相对来说，操作流程较多，成本偏高。
- » 哺乳动物细胞和昆虫细胞表达系统主要优点是蛋白翻译后加工机制最接近体内的天然形式，最容易保留生物活性，缺点是表达量通常较低，稳定细胞系建立技术难度大，生产成本高。



蛋白表达服务是一项环节较多的技术服务，为了获得理想的实验结果，需要公司与客户双方多次沟通。我们需要蛋白信息、载体信息、表达水平等各项尽可能详细的背景资料，在充分沟通后，制定出最优的表达方案。

为了保护客户的权益，我们在每一个服务开展之前，会依据客户的要求，明确交付标准，必要时签署保密协议，保证客户的研究项目的前瞻性。



万级细胞房



BTX电转化设备



全温柜式摇床



AKATA蛋白纯化设备



二氧化碳细胞培养箱



技术支持部



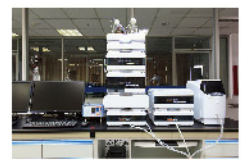
客户服务部



Biacore X100 分析仪



蛋白超声破碎设备



HPLC纯化检测设备

技术支持热线：400-025-1124



哺乳动物细胞蛋白表达

请交给钟鼎生物

我需要时间思考!

哺乳动物细胞体系蛋白表达服务

哺乳动物细胞系统蛋白表达是广为应用的人类复杂糖基化蛋白的表达系统，也是活性蛋白因子及各类受体蛋白的最佳表达系统，在蛋白表达过程中会形成接近天然蛋白的蛋白质折叠和聚合，具备活性蛋白所必须的空间结构和修饰，60%以上的药用蛋白产品由哺乳动物细胞表达系统获得。在科研领域，为了获得有活性的重组蛋白，哺乳动物细胞表达系统是首选方案。

钟鼎生物的哺乳动物表达体系以CHO（中国仓鼠卵巢细胞系统）和HEK293（人胚肾细胞系统）为表达宿主，筛选了高效的真核表达载体pMZ-X3（基于CMV启动子体系），为用户提供瞬时转染的哺乳动物细胞表达服务，制备mg级别的真核细胞重组蛋白，用于小规模实验应用及检测。

服务特色

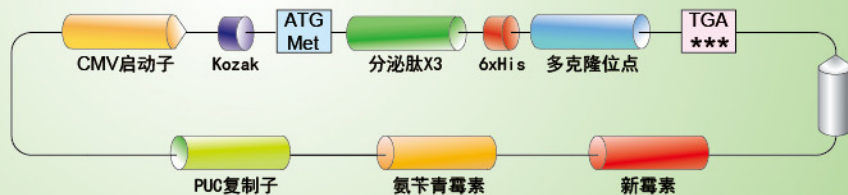
- 自主构建的pMZ-X3高效表达载体，含CMV启动子，Kozak序列、X3信号肽及6XHis标签，可实现高效分泌表达，利于重组蛋白的纯化与检测。同时携带Neomycin抗性基因，可通过G418筛选稳定高表达细胞株。
- ATCC原装进口的细胞株HEK293，传代次数15以内，遗传背景清晰，配合pMZ-X3质粒，转染效率在85%以上，无血清培养基进一步减少动物蛋白污染。
- 拥有独立的万级细胞房，4台细胞生物反应器，可同时进行贴壁与悬浮的细胞培养。单个实验台独立操作，避免交叉污染。
- 常规低压层析系统可用于带有标签的重组蛋白亲和和纯化，另外配套的AKATA纯化设备，可利用离子交换、分子筛等手段可以纯化无标签蛋白，提供纯度大于95%以上的蛋白制品。
- 蛋白质理化检测平台可提供重组蛋白的分子量、肽指纹图、N端测序分析；免疫学检测平台可以通过Western Blot方法、蛋白互作等方法进一步确认蛋白的理化及生物性质。

pMZ-X3分泌表达载体示意图（5.5kb）



姓名：钟小博
性别：男
年龄：5岁
学历：博士
头衔：砖家

擅长领域：蛋白、分子
女闺蜜：钟小美
性格标签：人见人爱
帅气多才，近视眼
吃货，小分夫



- 1、CMV启动子是公认的启动真核基因表达的最有力量的启动子，高效表达全靠它！
- 2、X3信号肽来源于细胞因子的天然信号肽，正确剪辑后源源不断的输送蛋白成熟体至细胞膜外。
- 3、多克隆区域之前，载体自带His标签蛋白，与目的蛋白融合表达，给纯化和检测带来便利。
- 4、Neomycin抗性，既可以作为筛选抗性，也可以使用G418筛选的稳转细胞株，自带PUC复制子，质粒可以在大肠杆菌中以高拷贝形式增殖。



哺乳动物细胞蛋白表达服务

哺乳动物体系有很多的先天优势, 获得天然修饰蛋白的概率大大增加, 钟鼎生物配套的cDNA文库、蛋白设计分析服务, 以及表达方案, 有助于提高蛋白表达的成功率和产量。

如果您需要mg级别的小量蛋白, 我们推荐使用pMZ-X3体系瞬转HEK293细胞; 如果需要构建稳定表达的细胞株, 推荐使用pMZ-X3体系瞬转CHO细胞后, 通过G418筛选高表达的稳定细胞株!

哺乳动物细胞蛋白表达实验步骤及交付标准

1、表达体系系统选择 (客户提供表达菌株的略过此步骤, 仅提供表达质粒的可选择需要电转化的表达菌株)

1.1、可选表达载体

» pMZ-X3相关系列载体 » 其他商业化的载体

1.2、可选表达宿主

» HEK293 CHO 或其他商业菌株

2、表达载体构建

实验周期

交付数据及实验材料

报价详情

A: 基因分析	基因合成	1、基因合成报告	基因合成价格随市场调整
亚克隆设计	2周左右	2、测序验证报告	亚克隆 0~1200元
合成基因	亚克隆	3、包含表达质粒的大肠杆菌DH10	(依据基因长度)
B: 亚克隆至载体pMZ-X3	1-2周	4、表达质粒	

3、瞬时转染小试

实验周期

可交付数据及实验材料

报价详情

C: 无内毒素质粒提取	细胞转染	5、瞬时转染的细胞裂解液	质粒制备 500元
D: 细胞瞬时转染	1周	(如提供需增加费用)	细胞培养及转染
E: 表达小试, 条件优化		6、细胞上清小样	4500元
F: 表达分析鉴定 (SDS-PAGE)	表达鉴定	(如提供需备注说明)	表达验证
G: Western Blot	1-2周	7、表达分析报告	1000元

4、细胞上清纯化小试

实验周期

交付数据及实验材料

报价详情

H: Ni柱亲和纯化	纯化鉴定	8、纯化、分析鉴定报告	蛋白纯化分析鉴定
I: 重组蛋白鉴定	1-2周	9、重组蛋白 (50-500ug, 80%纯度)	4000元

5、放大培养及蛋白纯化

实验周期

交付数据及实验材料

报价详情

J: 放大培养 (1-2L)	放大培养	8、蛋白纯度鉴定报告	表达纯化
K: Ni柱亲和纯化	2-3周	9、成品蛋白	6000~10000元
L: 纯化蛋白检测	表达纯化	(依据表达小试结果约定)	(依据小试得率报价)
M: 蛋白分装发货	1-2周		

补充说明

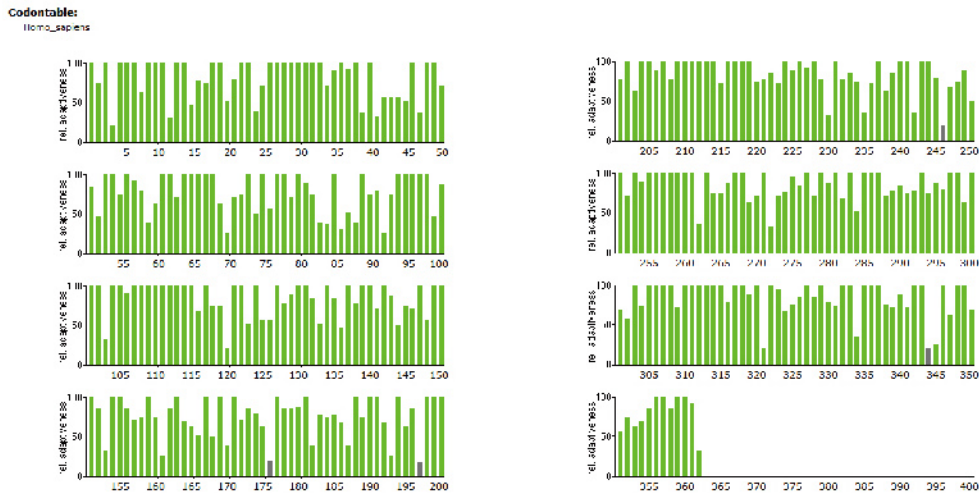
- 1、不同的蛋白表达量差异很大, 我们在小试阶段会交付尽可能多的目的重组蛋白。
- 2、正常情况下, 我们使用Mouse-Anti-His抗体检测重组蛋白, 如果选择不带标签, 请提供特异性的抗体用于WB检测。
- 3、如果选择不携带任何标签, 我们可以使用AKATA蛋白纯化设备分离目的蛋白, 但是纯化费用会增加50%。
- 4、即使蛋白不表达或表达量极低, 我们无法获得目的蛋白, 我们也会提供全套的实验流程和原始照片。



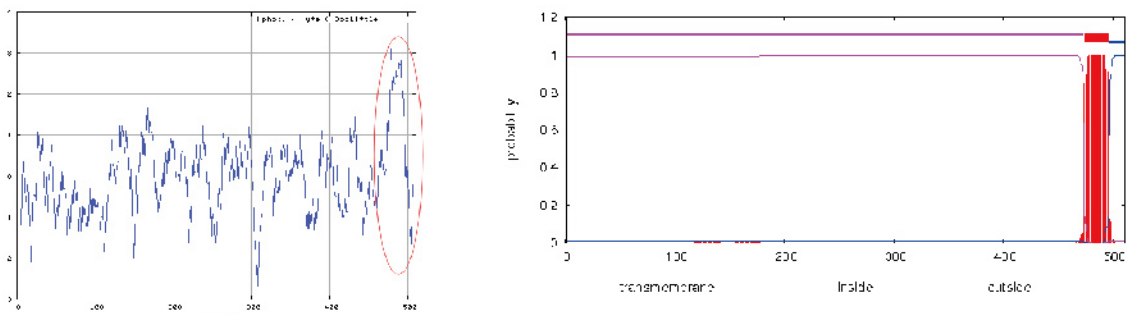
钟鼎用“真心”来做“真核”表达!



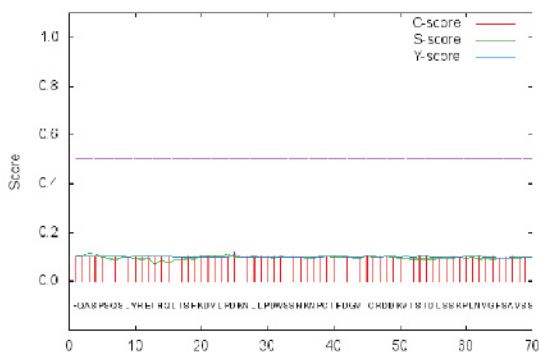
4.3 稀有密码子序列分析如下图所示 (红色: 使用频率低于10% 灰色: 使用频率低于20%, 绿色为正常频率密码子)



4.4 蛋白序列跨膜及亲疏水性分析



4.5 信号肽预测



#	Measure	Position	Value	Cutoff	signal peptide?
max. C		25	0.121		
max. Y		25	0.108		
max. S		3	0.117		
mean S		1-24	0.097		
D		1-24	0.102	0.450	NO

Name=Sequence SE='NO' D=0.102 D-cutoff=0.450 Networks=SignalP-noTM

综上所述:

- 1、蛋白理论分子量为 41KD, 属于正常分子量范围, 较适宜表达。
- 2、通过对基因密码子使用频率的分析, 如果以293细胞为表达宿主, 基因序列上使用频率低于20%的密码子X个, 使用频率低于10%的密码子X个, 优化后通过基因合成方式获得目的基因。
- 3、通过对蛋白的跨膜结构和亲疏水性分析, 蛋白整体呈亲水性, 但从473AA之后, 蛋白存在典型的跨膜结构, 建议去除后表达以提高成功率。
- 4、目的蛋白自身无信号肽, 添加GP67信号肽便于蛋白分泌表达。为了纯化方便, 考虑在C端添加His标签。



4.4.1. 无内毒素质粒抽提

使用Sigma公司Endotoxin Free质粒重量抽提试剂盒抽提pMZ-X3-gene表达质粒, 经LAL法测定 <0.1 EU/ug。

4.4.2. 待转染细胞预处理

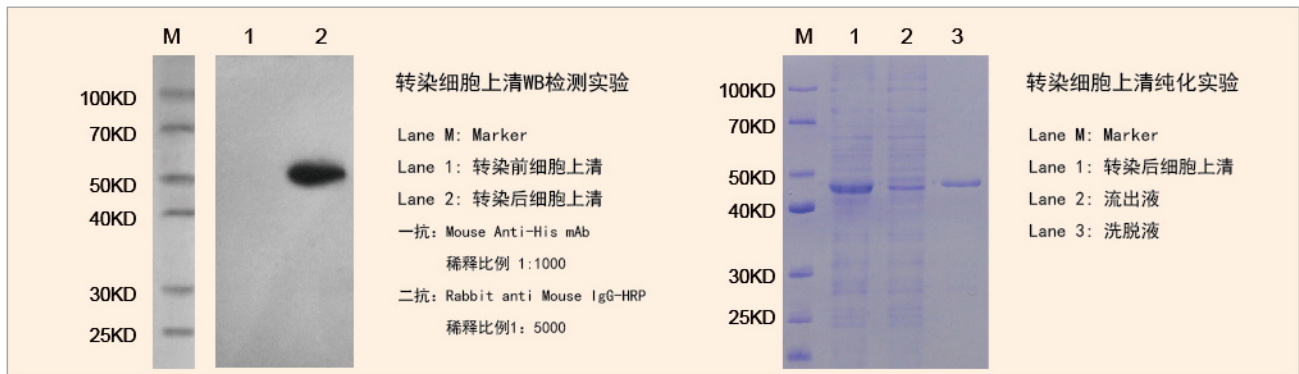
转染前一天, 将形态良好、生长旺盛处于对数生长期的HEK93T细胞用胰蛋白酶消化后稀释至 4×10^5 /mL的密度, 接入24孔细胞培养板。轻轻振荡使细胞均匀铺在细胞板孔内, 每孔500ul, 用DMEM高糖培养基培养和传代细胞。平放在 37°C 、5%二氧化碳培养箱中培养。待细胞长至80-90%汇合度时, 可以开始转染操作。

4.4.3 细胞转染

取0.8ug质粒, 加入50ul Optipro SFM, 混匀后加入2ul 转染试剂, 再次混匀后室温孵育20min。将DNA-转染试剂复合物滴加至24孔板中, 轻轻混匀, 37°C 培养箱培养48h。

4.4.4 Western Blot检测培养上清

1. 样品上样0.01ug, 上样完毕后, 聚丙烯酰胺凝胶先90V跑完积层胶, 再将电压升至200V直到电泳结束。电泳结束后, 取下凝胶进行转膜, 恒压100V转膜, 约为1.5小时。取下膜后先用PBS洗涤4次, 每次5分钟。然后置于5%脱脂奶粉封闭液中封闭 37°C 1小时。用封闭液稀释一抗, 膜在一抗稀释液中 37°C 反应1小时。洗膜4次, 每次5分钟; 用含5%牛奶的封闭液稀释二抗。膜在二抗中 37°C 反应1小时, 洗膜ECL显影。



4.5 XX-His 融合蛋白的表达与纯化

4.5.1待转染细胞准备

将处于对数生长期的293T细胞用Trypsin消化后稀释至 4×10^5 /mL的密度, 种于2L的滚瓶中。每个滚瓶加200ml DMEM高糖培养基(含3%胎牛血清), 调节滚瓶转速至20转/小时, 使细胞均匀贴到转瓶表面, 约24小时左右, 当细胞贴壁面汇合至90%时进行转染。

4.5.2 DNA预处理

取100ug无内毒素质粒, 加入13ml OptiSFM, 混匀后加入250ul 转染试剂, 再次混匀后室温孵育20min。

4.5.3 细胞转染与表达

将DNA-转染试剂复合物滴加至滚瓶中, 轻轻混匀, 调节滚瓶转速20转/小时, 37°C 培养箱培养10个小时后换3%血清的DMEM中糖500ml, 调节滚瓶转速40转/小时。表达4天后收取上清。

4.5.4 XX-His蛋白的纯化

将培养上清用0.22um滤膜过滤, 滤液以0.5 mL/min的流速通过Ni层析柱;

50mM Tris-Hcl (PH=8.0, 150mM NaCl) 平衡层析柱, 1ml/min;

50mM Tris-Hcl (PH=8.0, 150mM NaCl)、50mM 咪唑洗杂, 清洗10个柱体积, 1ml/min;

50mM Tris-Hcl (PH=8.0, 150mM NaCl)、250mM 咪唑洗脱, 流速0.5ml/min。



了解钟鼎的更多信息



钟鼎生物技术有限公司是一家专业从事生命科学研究、产品开发和技术的公司。提供分子生物学技术服务, 基因工程生物学操作, 蛋白表达和纯化, 蛋白理化性质分析, 抗体制备等免疫学相关技术服务; 在提供生物技术服务的同时, 开发出一系列配套的高性价比的附属产品, 经过多方的使用及改进, 更加贴近客户使用习惯, 有助于提高实验效率。

2013年5月, 公司喜迁至南京市孝陵卫双拜巷78号钟山生命科技园, 公司新建1500平米的实验区和办公区, 装配了万级的细胞操作间和RNA操作间, 增添了荧光定量PCR仪器, 电转化设备及HPLC纯化检测等设备。实验环境和工作环境进一步改善。

2014年, 快速成长的钟鼎公司加强基础平台创新及新技术开发, 同年申请并通过8项专利, 筹建了检测实验平台, 可帮助科研用户检测植物激素、糖类、酶类、生物碱、氮磷钾等元素等指标。经过我们的不懈努力, 在当地政府的大力支持下, 被评定为“江苏省民营高科技企业”。

2015年, 公司引进蛋白质组学、免疫学、生理生化学等多名高端技术人才, 形成以博士为主的核心技术团队, 同年顺利获批“国家级高新技术企业”, 成为名副其实的“高”“精”“尖”科技单位。

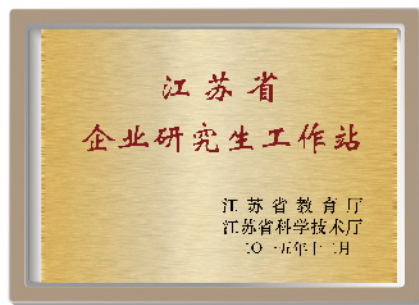
经过几年的高速发展, 钟鼎生物在蛋白表达、抗体制备、Southern Blot、激素检测等项目脱颖而出, 逐渐成为行业的标杆, 已协助客户发表中英文论文500余篇, 其中不乏IF>10的高水平文章。我们正以鸾凤集梧桐的姿态广纳贤才, 踌躇满志前行!



高新技术企业证书



民营科技企业证书



企业研究生工作站



诚信笃实 钟鼎之志

南京钟鼎生物技术有限公司主要以技术服务外包为主,完善的技术服务平台拥有核心的技术力量、先进的设备资源、专业的客户服务体系。可以为广大的科研院所及医药、食品、农业研发及检测机构提供最优质的技术服务项目。钟鼎生物的技术服务平台主要分为两大部分,其一为生物学试剂及实验材料定制类部分,其二为生物科研样品检测类部分。



定制类: 为科研工作者提供基因合成、基因亚克隆、原核、酵母及真核体系重组蛋白表达、多克隆抗体制备、单克隆抗体细胞株制备、抗体测序及重组表达、ELISA试剂盒开发、胶体金试纸条开发等项目。

检测类: 为科研工作者提供植物/土壤/水体中的理化检测,例如氮含量测定、植物激素测定等;同时我们的生物学平台可以提供 Southern Blot/Northern Blot/Western Blot检测服务及蛋白GST-PULL-Down, 酵母双杂交等项目检测蛋白互作,蛋白质组学平台可以便捷的进行蛋白质理化性质解析检测。

选择钟鼎的4大理由

1

专家级别的技术平台

美国R&D公司前技术主管领军
的博士团队,近20年经验。

2

国家级高新技术企业

国家科技部火炬中心认定的
2015年第一批高新技术企业

3

强劲有力的硬件平台

进口设备,进口试剂原料耗
材,训练有素的工程师

4

外包服务经验丰富

钟鼎生物以定制CRO服务为核心
业务,具有丰富的外包经验



那一年

你在Southern, 我在Northern

等“带”的日子里

心中的执念, 犹如探针在暗盒中的光芒

刹那的耀眼!

道路的荆棘如EMSA阻滞眼前

夜空中SYBR Green的荧光流转

HRM曲线划开

一往无前的气概!

抗体在手, 快如利剑

重组蛋白, 如战锤般砸向课题的关隘

你(A)我(T)她(G)他(C)

汇成铁骑洪流

在SCI, 插满钟鼎的标签!



我们恪守“诚信笃实，钟鼎之志”的企业理念，一步一步走向未来：

2011年，“钟鼎生物”这颗满含希望的种子破土而出，不鸣则已，一鸣惊人，业绩保持300%的增长。

2013年，钟鼎生物发展壮大，公司搬迁至钟山生命科技园，面积达到1500m²，各个服务平台日趋成熟。

2014年，组建生理生化检测平台，申请通过8项专利，入选“江苏民营高科技企业”，公司业绩一飞冲天，扶摇直上。

2015年，申请并通过“国家高新技术企业”，并顺利入选“南京高校企业研究生工作站”！

..... 筚路蓝缕 以启山林，我们在路上.....