

創世紀

Biogenesis

Newsletter

重組蛋白純化

- 親和層析法簡介 2

超便利的蛋白質電泳預鑄膠片

- RunBlue gels 12

超快速的蛋白質染劑

- InstantBlue 15

蛋白質定量試劑

- BradfordUltra 16

幫你的蛋白質穿上防護衣

- NVoy 技術 18

NVoy 應用於蛋白質的 refolding process

- NVoy Refold™ Kit 20

NVoy 應用於蛋白質的純化及分析過程

- NVoy Stabil-PAC™ Kit 21

創世紀生物有限公司

服務信箱：service@biogenesis.com.tw

服務專線：0800-211-667

台北 02-26558877

台中 04-22602466

高雄 07-3422370

花蓮 03-8463953

竹南 037-687493

重組蛋白純化——親和層析法簡介

由於基因重組技術的進步，越來越多研究者試圖將特定基因選殖至表現載體，並大量表現重組蛋白；但是不論以何種宿主細胞內除了重組蛋白質以外，仍有上千種以上細胞使用的蛋白質，因此在收集粗蛋白後的首要工作，就是面對將重組蛋白由粗蛋白中純化出來的問題。一般純化蛋白值的方式包括了鹽溶鹽析、膠體過濾、離子交換、親和層析等方法，而親和層析法正是廣泛應用於一般實驗室甚至工業級純化常用的蛋白質純化方法。

親和層析法是利用物質間的親和力強弱，將親和力較強的分子保留在擔體上並移除親和力較弱的其他分子。親和層析法常使用固相擔體，常用的擔體為很小的珠子(silica resin or agarose bead)，這些珠子上可以接上特定分子，例如螯合物或是 glutathione，任何可以抓到重組蛋白質的分子都可以接到珠子上。在親和層析法中，一定要先找到有親和性配對的分子，例如：抗體和抗原、酵素和基質、荷爾蒙和接受器、或是金屬離子與特定的標定物(tag)。以抗體和抗原為例，若將抗體接到珠子上然後讓樣本流過，則抗體就會將其中所含的抗原抓出來，其他不要的分子就會被沖洗下來，接下來把所要的抗原溶離下來，就可以得到一定純度以上的抗原。

市面上最常使用的蛋白質純化方式，是先將 His-Tag 或 GST-Tag 基因接在重組蛋白質，並使用 Ni-column 或 Glutathione-column 進行重組蛋白質純化，其廣泛應用的原因如下：

1. 市面上已有相當多內含 His-Tag 或 GST-Tag 的載體，只要將重組蛋白質基因接在正確的位置上即可獲得 His-Tag 或 GST-Tag Fusion protein；如果是使用 His-Tag fusion protein，甚至可以直接將 His-Tag 基因設計在 primer 上，並以 PCR 的方式將 His-Tag 接在重組蛋白質基因上。
2. 使用 His-Tag 或是 GST-Tag 純化的流程相當簡單，只要經過 Loading、Washing、Elute 這三個步驟就可以得到一定純度以上的蛋白質。
3. 如果搭配 FPLC 儀器進行純化，可獲得更高純度或更大量的重組蛋白。

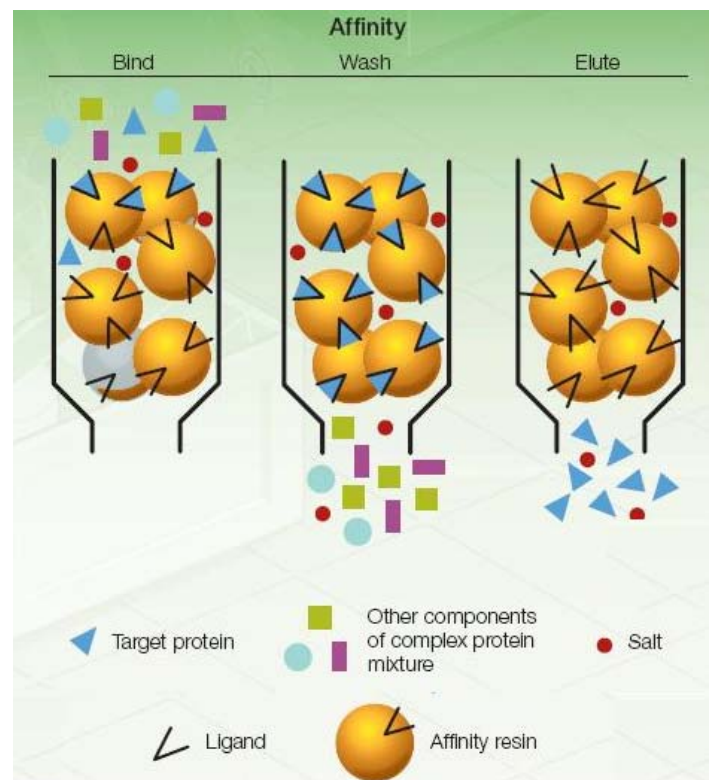


Fig.1 重組蛋白使用親和層析法進行蛋白質純化

以下我們將分別介紹 GST-Tag 及 His-Tag 的純化原理及特性。

GST-Tag 純化原理

GST-Tag fusion protein 是使用 glutathione S-transferase (GST)與 glutathione 的親和特性（酵素和基質）進行重組蛋白純化。使用者先選擇含 glutathione S-transferase 基因的載體（vector），並將重組蛋白質的基因接在 GST 基因後方製作出 glutathione S-transferase (GST)-fusion protein。Glutathione 在進行蛋白質純化前預先 coating 在 Agarose beads 上作為 glutathione-Agarose resin，當 GST-fusion protein 通過 glutathione-Agarose resin 時，GST-Tag 與 glutathione 會產生親和性反應，並結合在 glutathione coated resin 上(Fig.1)，此時未含 GST 的蛋白質會通過 resin 並使用 wash buffer 達到純化目的。最後在 elute 步驟中放入含有 free glutathione 的 elute buffer，就能使 GST-protein 脫離 resin 並溶解於 elute buffer。

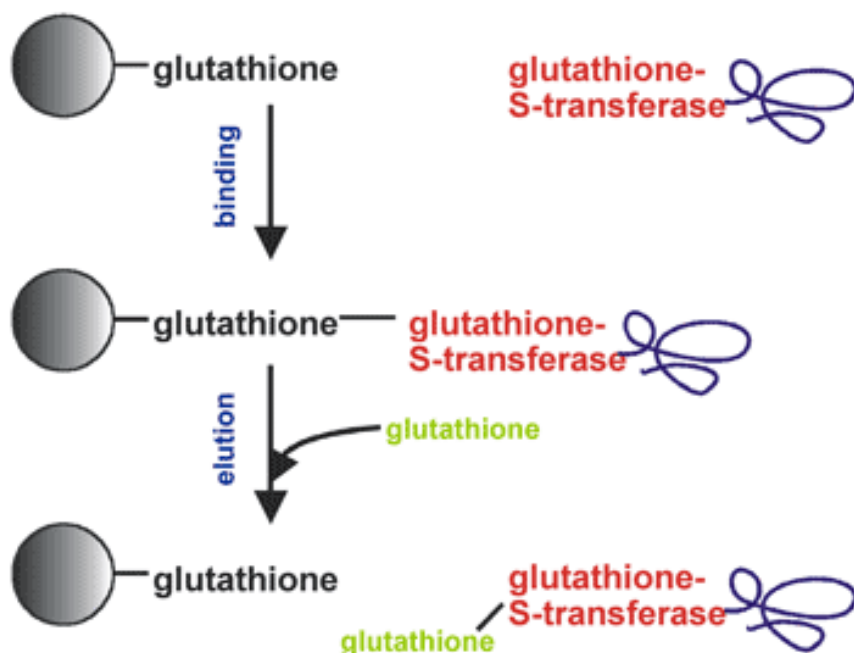


Fig.2 GST-Tag fusion protein 純化流程

GST-Tag 由 220 個 amino acid 組成，分子量約為 26KDa，相對於 His-Tag (6 histidine)來說相當巨大；在 commercial vector 的 GST-Tag 後方常會先接上 thrombin domain，在純化的 GST-fusion protein 的過程中可使用 thrombin 切除 GST-Tag 並使 GST-Tag 留在 column 中，最後 elute 將得到不含 GST-Tag 的重組蛋白。

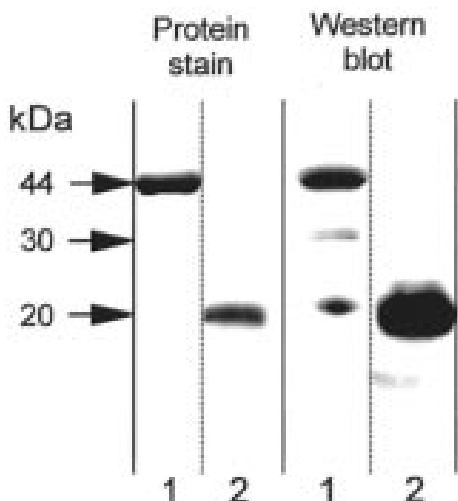


Fig.3 GST-CyP-D 純化與 Thrombin cleavage

GST-CyP-D 大量表現後以 glutathione-Sepharose 進行純化，並同時使用 Thrombin 將 GST-Tag 切除。純化的蛋白質以 SDS-PAGE 分離，分別以 Coomassie Blue 染蛋白質，及 anti-CyP-D antibodies 進行 Western Blot。其中 Lane 1 是含有 GST-Tag 的重組蛋白，而 Lane 2 是使用 Thrombin 切除 GST-Tag 後純化的重組蛋白。

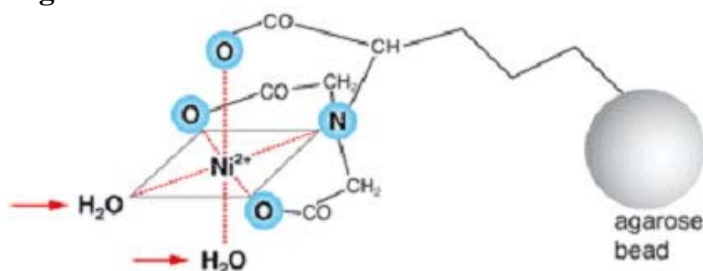
(Woodfield, *Biochem. J.*, 1998, 336)

His-Tag 純化原理

Polyhistidine (His)-Tag 純化是屬於金屬親和層析法 (immobilized metal-ion affinity chromatography, IMAC) 的一種，主要是利用蛋白質的組織胺酸 (histidine) 的氮原子作為路易斯鹼 (Lewis base)，與金屬離子作為具有空價軌域的路易斯酸 (Lewis acid) 形成配位鍵結。當 His-Tag fusion protein 通過 Ni-resin 鎳離子空出的配位鍵與 His-Tag 結合使 fusion protein 留在 resin 上；經過 wash 步驟後，再以高濃度的 imidazole 與 His-Tag 競爭配位鍵並使 fusion protein 脫離完成蛋白質純化。

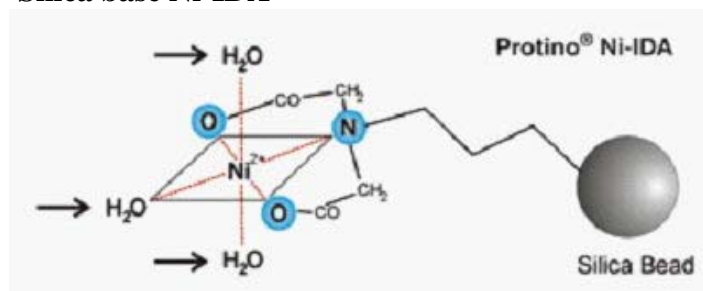
在 IMAC 系統裡，主要利用多牙 (multidentate) 螯合化合物來螯合金屬，牙數愈多，占據金屬的配位數則愈多，螯合金屬的力量愈強；但相對的，蛋白質上的胺基酸能佔有的金屬配位數則為少。在 His-Tag 純化系統中常使用 IDA、NTA、TED 與鎳離子 (Ni^{2+}) 進行螯合，其結構如下：

Agarose base Ni-NTA :



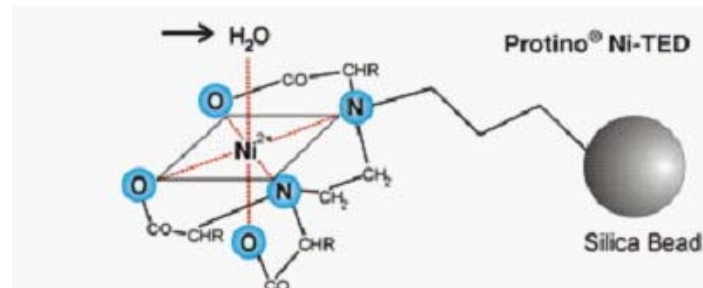
四牙的 nitrilotriacetic acid (NTA) 結合鎳離子比 IDA 提供更強的鍵結力，但蛋白質能結合的配位數降為 2 個，造成 IMAC 系統與蛋白質的結合能力較 IDA 弱。

Silica base Ni-IDA :



具有三牙的 iminodiacetic acid (IDA)，鎳離子 (Ni^{2+} ，具八面體結構具有六個配位數) 將會結合氮原子和二個羧基上的氧，所以讓出 3 個配位數給蛋白質；蛋白質結合量為 IMAC 系統中最高。

Silica base Ni-TED :



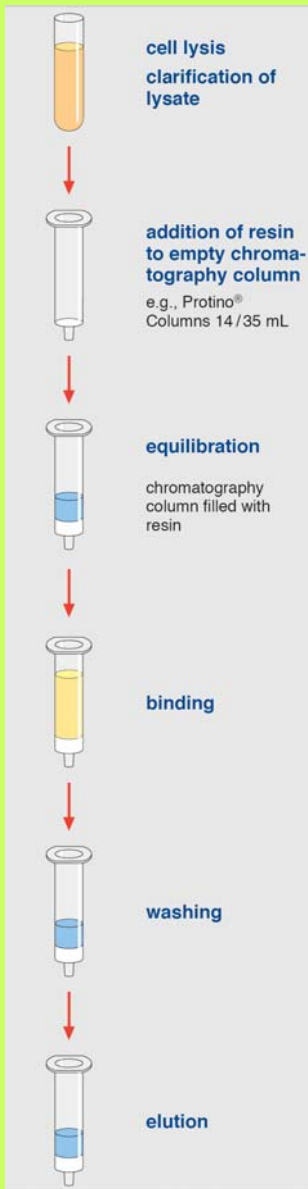
五牙的 Tris-carboxymethyl ethylene diamine (TED) 與鎳離子的鍵結力最強，但是與蛋白質能結合的配位數也只剩一個，雖然純化的蛋白質量最少，但是蛋白質的純度最高。

雖然 IMAC 以鎳離子提供 His-Tag fusion protein 鍵結數，但是 resin 上的吸附的螯合劑 (TED、IDA or NTA) 數量也是 His-Tag fusion protein 產量的關鍵。以 MN Protino[®] Ni-IDA 與 Ni-NTA 為例，Ni-IDA 提供 3 個蛋白質鍵結位置而 Ni-NTA 提供 2 個蛋白質鍵結位置，但是在 Ni-IDA silica bead 上只有 15 個 IDA 而 Ni-NTA agarose bead 上有 100 個 NTA，最後 Ni-NTA agarose bead 能得到的蛋白質量也比 Ni-IDA 多 (50mg/ml for Ni-NTA ; 20mg/g for Ni-IDA)。

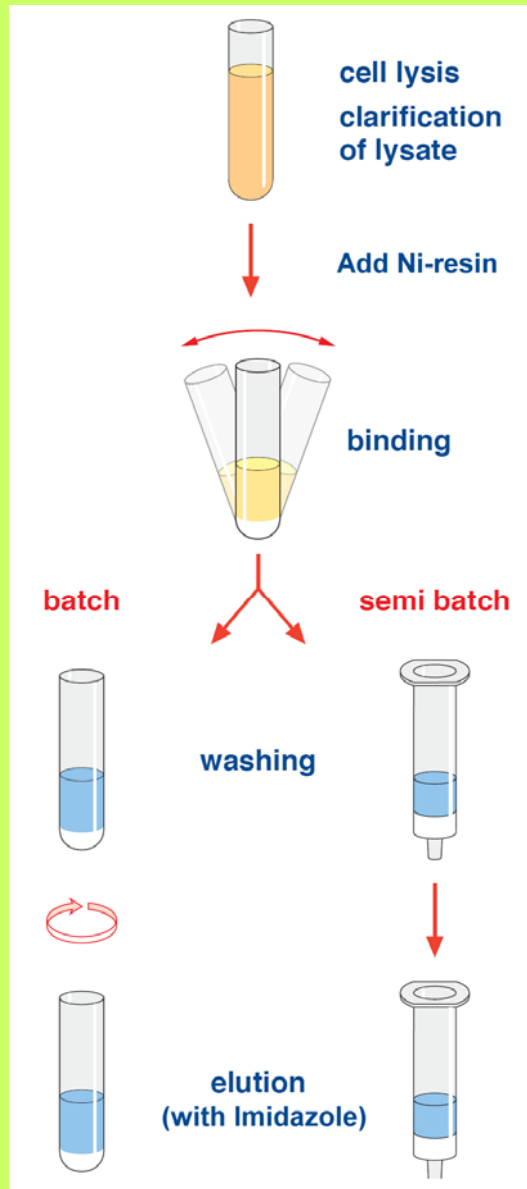


你可以這樣輕鬆進行蛋白質純化

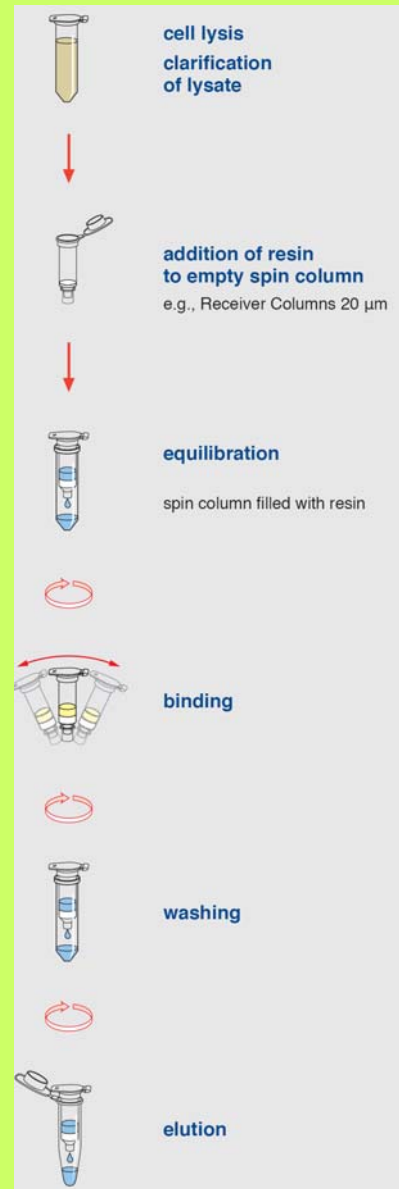
Gravity-flow chromatography



Batch / Semi batch



Spin column procedure



Protino® Ni-TED / IDA
(Resin or Column)
Protino® Ni-NTA Agarose

Protino® Glutathione
Agarose 4B

Protino® Ni-TED / IDA Resin
Protino® Ni-NTA Agarose

Protino® Glutathione Agarose 4B

Protino® Ni-TED / IDA Resin
Protino® Ni-NTA Agarose

Protino® Glutathione
Agarose 4B

Agarose base His-Tag Purification

Protino[®] Ni-NTA



產品特色：

- ▶ 使用 NTA (nitrilotriacetic acid) 作為螯合物，具有 2 個蛋白質結合位
- ▶ 對於 His-Tag 具有高親和力，且蛋白質結合能力高達 50mg/ml
- ▶ 適用於 native or denature protein purification
- ▶ 適用性廣泛，不論分子大小，或是低表現度的重組蛋白都可使用
- ▶ 可用於各種純化方式，包括 batch binding、gravity flow、FPLC
 - 不需另外購買 superflow 或是 Fast Flow
- ▶ Protino[®] Ni-NTA 提供 agarose 及 FPLC column 兩種包裝供客戶選擇
- ▶ 不須更換既有的蛋白質純化流程，無痛升級

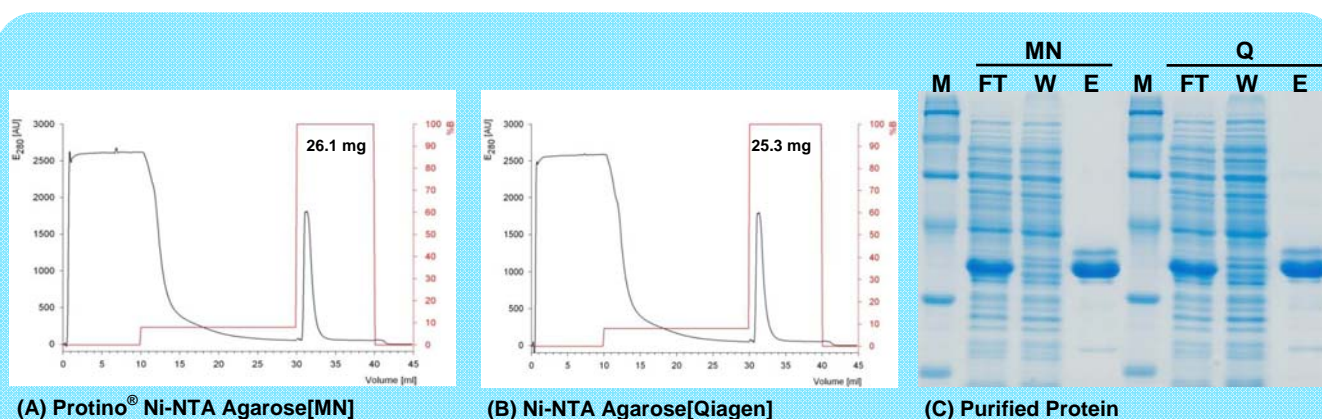


Fig.1 Recombinant His-GFPuv protein 使用 ÄKTAprime[™] Plus 分別以 1ml MN Protino[®] Ni-NTA Agarose 與 1ml Qiagen Ni-NTA Agarose 進行純化，並將純化後的蛋白質 SDS-PAGE 分析。MN 與 Qiagen Ni-NTA 在不不論是蛋白質純化量與純度大致相同。(FT=flow through ; W=wash ; E=elute)

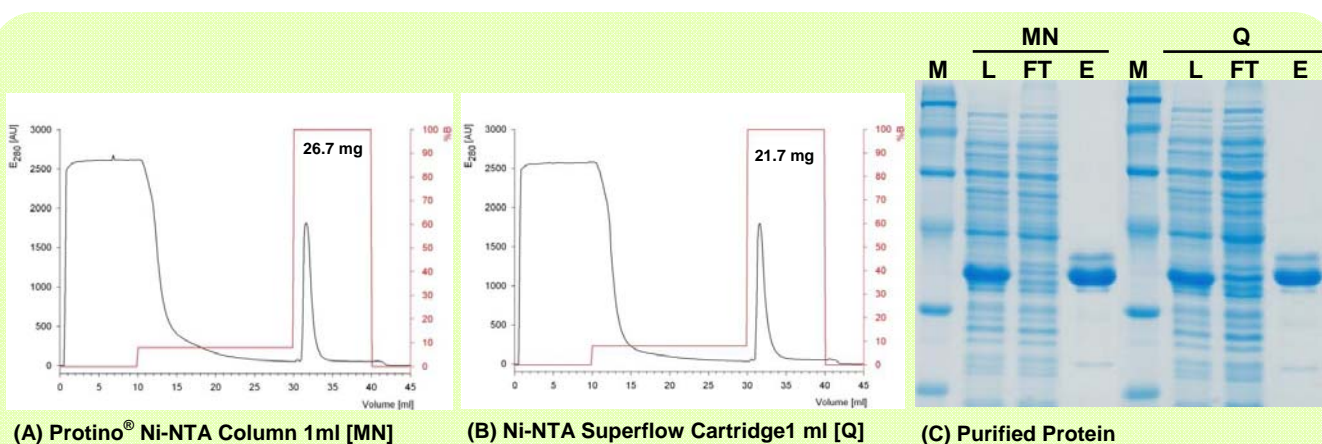


Fig.2 Recombinant His-GFPuv protein 使用 ÄKTAprime[™] Plus 分別使用 MN Protino[®] Ni-NTA Column 1ml 與 Qiagen Ni-NTA Superflow Cartridge 1ml 進行純化，並將純化後的蛋白質 SDS-PAGE 分析。MN 獲得的蛋白質質量較 Qiagen Ni-NTA Superflow 稍多，且蛋白質純度大致相同。(L=Ecoli Lysate ; FT=flow through ; E=elute)

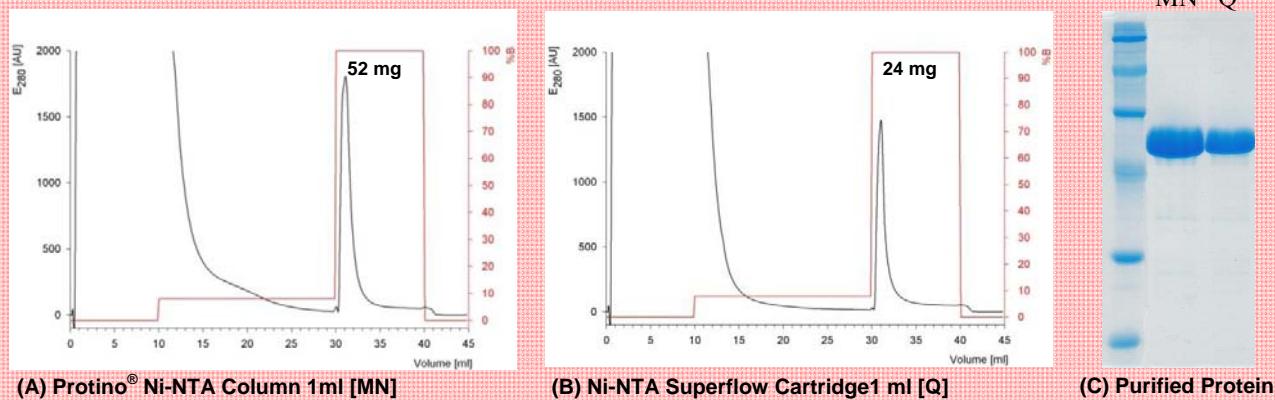


Fig.3 Recombinant His-Aspartase protein (192KDa)使用 ÄKTAprime™ Plus 分別使用 MN Protino® Ni-NTA Column 1ml 與 Qiagen Ni-NTA Superflow Cartridge 1ml 進行純化，並將純化後的蛋白質 SDS-PAGE 分析。MN 獲得的蛋白質量較 Qiagen Ni-NTA Superflow 多兩倍，表示 MN Protino® Ni-NTA 在大分子蛋白質純化效果比 Qiagen 好，且蛋白質純度大致相同(at C)。

產品特性

Matrix	6 % beaded agarose (cross linked), precharged with Ni ²⁺
Chelating ligand	NTA (nitrilotriacetic acid)
Bead size	45 – 165 μm
Binding capacity	Up to 50 mg/mL (Binding capacity will vary for each His-Tag protein)
Max linear flow rate	300 cm/h
Format	Bulk resin (50 % aqueous suspension in 30 % ethanol) ready-to-use 1 mL and 5 mL FPLC™ columns

訂購資訊

產品名稱	包裝	內容物	產品編號
Protino® Ni-NTA Agarose	25mL		745400.25
	100mL	settled beaded agarose	745400.100
	500mL		745400.500
Protino® Ni-NTA Columns 1 mL	5 preps	FPLC Column	745410.5
Protino® Ni-NTA Columns 5 mL	1 prep		745415.1
	5 preps	FPLC Column	745415.5

Silica base His-Tag Purification

Protino[®] Ni-TED

產品特色：

- ▶ 使用 TED (Tris-carboxymethyl ethylene diamine) 作為螯合物，具有 1 個蛋白質結合位
- ▶ 螯合物以五牙抓住鎳離子，避免金屬離子脫離
- ▶ 對於 His-Tag protein 專一性極高，比起其他 IMAC 系統更能避免非專一性結合，而得到的蛋白質純度也最高。
- ▶ 為 silica base 的 Ni-TED，能在高壓、高流速下進行蛋白質純化且不變形。
- ▶ 為白色粉末型態，以常溫保存。

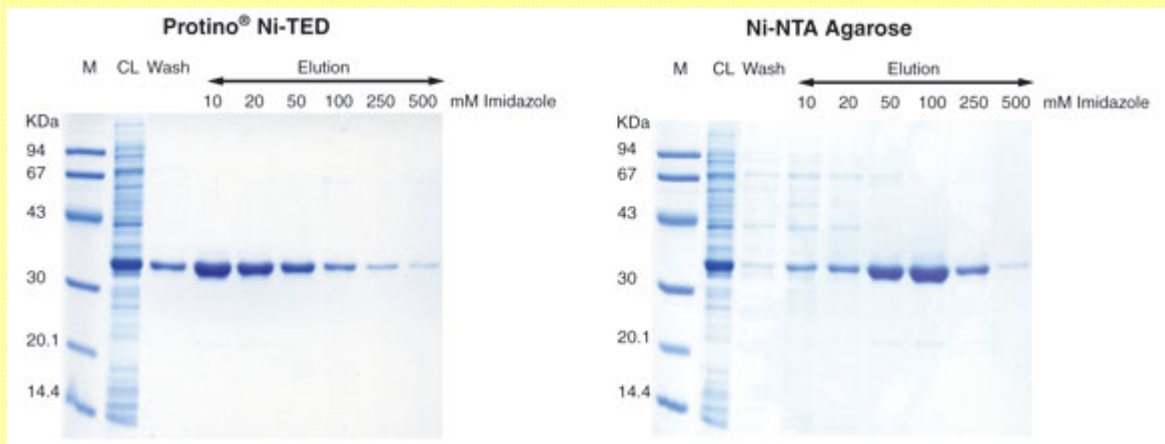


Fig.1 Recombinant His-GFP protein 分別以 Protino Ni-TED 與 Ni-NTA Agarose 進行純化，並分別以內含 10~500mM Imidazol 的 elute buffer 進行實驗。Protino Ni-TED 能在低濃度 Imidazol 就將 His-GFP elute，而 Ni-NTA 則在 50~100mM Imidazol 才能 Elute，而且 Ni-TED 得到的蛋白質純度比 Ni-NTA 更高。(M: Protein Marker ; CL: Clear Lysate)

產品特性

Chelating ligand	TED (tris-carboxymethyl ethylene diamine)
Matrix	Macroporous silica
Physical form	Dry matrix, precharged with Ni ²⁺
Binding capacity	10 mg/g resin (refers to 6xHis-GFPuv)
Max pressure	145psi (10bar)
Format	Bulk resin ready-to-use 40mg, 250mg and 500mg gravity-flow columns

訂購資訊

產品名稱	包裝	蛋白質結合量	產品編號
Protino [®] Ni-TED Resin	5g、30g、100g、300g	10mg/g resin	745200.5/.30/.100/.600
Protino [®] Ni-TED 150 Packed Columns	10 preps、50 preps	400ug	745100.10/.50
Protino [®] Ni-TED 1000 Packed Columns	5 preps、50 preps	2.5mg	745110.5/.50
Protino [®] Ni-TED 2000 Packed Columns	5 preps、25 preps	5mg	745120.5/.25

Silica base His-Tag Purification

Protino[®] Ni-IDA

產品特色：

- ▶ 使用 IDA (iminodiacetic acid) 作為螯合物，具有 3 個蛋白質結合位
- ▶ 高產量及高回收率，即使低濃度蛋白質也可進行純化
- ▶ 對於 His-Tag protein 專一性極高，比起其他 IMAC 系統更能避免非專一性結合，而得到的蛋白質純度也最高。
- ▶ 為 silica base 的 Ni-TED，能在高壓、高流速下進行蛋白質純化且不變形。
- ▶ 為白色粉末型態，以常溫保存。

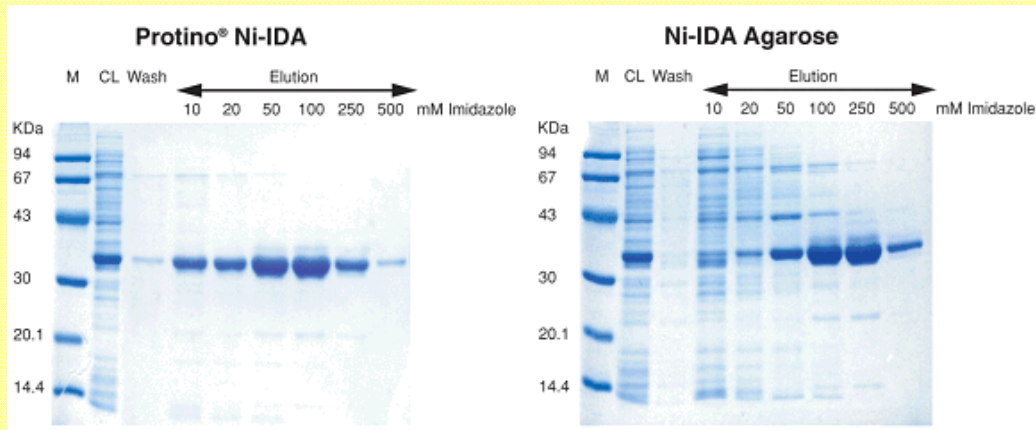


Fig.1 Recombinant His-GFP protein 分別以 Protino Ni-IDA 與 Ni-IDA Agarose 進行純化，並分別以內含 10~500mM Imidazole 的 elute buffer 進行實驗。Protino Ni-IDA 能在 50~100mM Imidazole 將 His-GFP elute，而 Ni-IDA Agarose 則在 100~250mM Imidazole 才能 Elute，而且 Ni-IDA Agarose 在 10~100mM Elute 仍有雜蛋白。(M: Protein Marker；CL: Clear Lysate)

產品特性

Chelating ligand	IDA (iminodiacetic acid)
Matrix	Macroporous silica
Physical form	Dry matrix, precharged with Ni ²⁺
Binding capacity	20 mg/g resin (refers to 6xHis-GFPuv)
Max pressure	145psi (10bar)
Format	Bulk resin ready-to-use 40mg, 250mg and 500mg gravity-flow columns

訂購資訊

產品名稱	包裝	蛋白質結合量	產品編號
Protino [®] Ni-IDA Resin	5g、30g、120g、300g	20mg/g resin	745210.5/.30/.120/.600
Protino [®] Ni-IDA 150 Packed Columns	10 preps、50 preps	800ug	745150.10/.50
Protino [®] Ni-IDA 1000 Packed Columns	5 preps、50 preps	5mg	745160.5/.50
Protino [®] Ni-IDA 2000 Packed Columns	5 preps、25 preps	10mg	745170.5/.25
Protino [®] Protino Multi-96 Ni-IDA	1x96 plate、4x96 plate	1mg/well	745300.1/.4

Ni-NTA、Ni-IDA 與 Ni-TED 的比較

	Ni-NTA	Ni-IDA	Ni-TED
擔體形式	Agarose bead	Silica resin	Silica resin
螯合物	NTA (nitrilotriacetic acid)	IDA (iminodiacetic acid)	TED (Tris-carboxymethyl ethylene diamine)
Ni ²⁺ 與 His-Tag 結合位數目	2	3	1
Ni ²⁺ 與螯合物結合位數目	4	3	5
螯合物密度	最高	最低	介於 Ni-NTA 與 Ni-IDA
Binding Capacity (refers to 6xHis-GFPuv)	≤ 50mg/mL	≤ 20mg/g	≤ 10mg/g

產品特性	對於 His-Tag protein 具有高度專一性結合		
	Elute protein 所需的 imidazol 濃度較 Ni-TED 及 Ni-IDA 高	Elute protein 所需的 imidazol 濃度較 Ni-NTA 低	
	蛋白質 binding 能力最高，產量最多，可適用於低濃度的 sample	蛋白質 binding 能力較 Ni-TED 高，可適用於低濃度的 sample	螯合物穩定度最高，能降低金屬離子析出
	蛋白質濃度最高	蛋白質濃度高於 Ni-TED	蛋白質純度最高

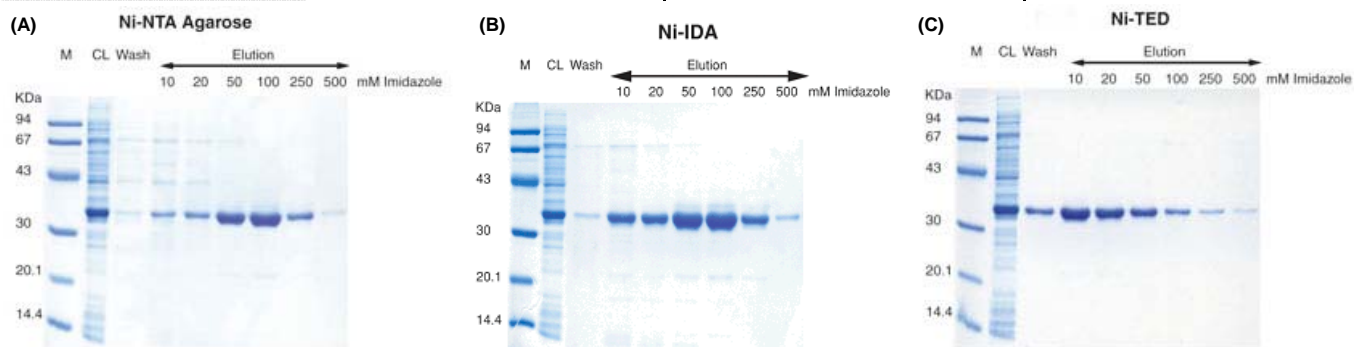


Fig1. Ni-NTA、Ni-IDA 及 Ni-TED 分別以 gravity column 對 6xHis-GFPuv 進行純化，使用 10~500mM Imidazole elute recombinant protein，並將各收集液（包括 wash flow through）以 SDS-PAGE 分析。

Ni-TED 由於與蛋白質的結合能力最小，因此在 10mM Imidazol 的環境下就能將 6xHis-GFPuv elute，且幾乎沒有其他蛋白質 band；Ni-IDA 的 target protein 在 10~250mM Imidazol 濃度下都可以 elute 6x-His-GFPuv（最佳濃度為 50~100mM），但是非目標蛋白質的量較 Ni-TED 多；Ni-NTA 需要在高濃度 Imidazol 下才能 elute 6xHis-GFPuv（50~250mM）。

該選擇 Ni-NTA、Ni-IDA 還是 Ni-TED ？

➡ 一般還是由蛋白質結合量或是蛋白質純度來選擇適合的蛋白質純化 resin。

蛋白質結合量：Ni-NTA > Ni-IDA > Ni-TED

蛋白質純度：Ni-TED > Ni-IDA > Ni-NTA

如果擔心蛋白質無法與 resin 結合，建議還是先選用 Ni-NTA 比較保險

（不過蛋白質仍有可能因為氨基酸組成、蛋白質結構、分子量等因素影響與 resin 的結合能力）

Agarose base GST-Tag Purification

Protino[®] Glutathione Agarose 4B

產品特色：

- ▶ 純化效果相當於 Glutathione Sepharose™ 4B
- ▶ 可直接沿用原有純化步驟，不需變更
- ▶ 可用於各種純化方式，包括 batch binding、gravity flow、FPLC — 應用範圍廣
- ▶ 適用性廣泛，不論分子大小，或是低表現度的重組蛋白都可使用

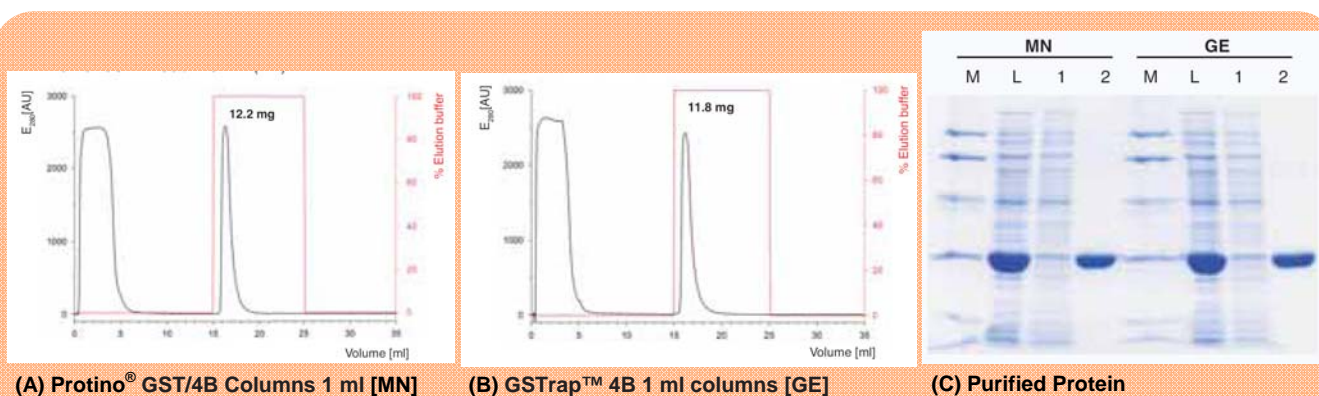


Fig.1 Recombinant GST-DsRed protein (1ml sample)使用 ÄKTAprime™ Plus 分別以 **Protino[®] GST/4B Columns 1 ml** 與 **GE GSTrap™ 4B 1 ml columns** 進行純化，並將純化後的蛋白質 SDS-PAGE 分析。MN 與 GE 純化 GST-protein 在不不論是蛋白質純化量與純度大致相同。
(L=E.coli Lysate ; 1=column flow through ; 2=elute)

產品特性

Ligand	Glutathione, linked via sulfur atom
Spacer arm	12 atoms
Matrix	4 % beaded agarose
Bead size	90 μm
Binding capacity	>8 mg recombinant GST/mL (Binding capacity will vary for each GST-Tag protein)
Max linear flow rate	250cm/h
Format	Bulk resin (75% (v/v) aqueous suspension containing 20% ethanol) ready-to-use 1 mL and 5 mL FPLC™ columns

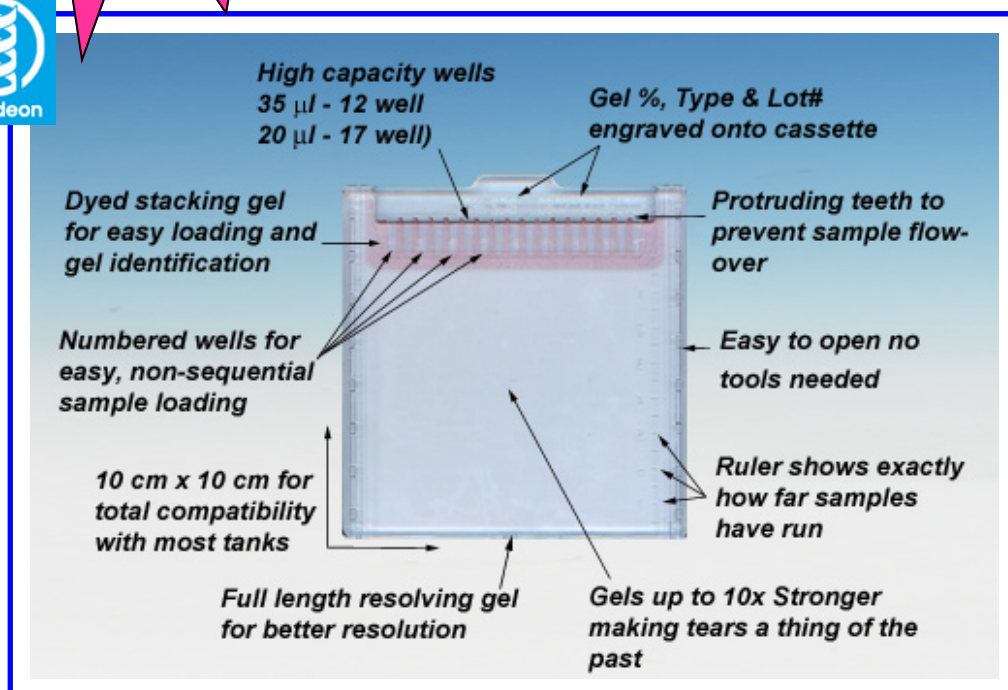
訂購資訊

產品名稱	包裝	內容物	產品編號
Protino [®] Glutathione Agarose 4B	10mL	settled beaded agarose	745500.10
	100mL		745500.100
Protino [®] GST/4B Columns 1 mL	5 preps	FPLC Column	745510.5
Protino [®] GST/4B Columns 5 mL	1 prep	FPLC Column	745515.1
	5 preps		745515.5

超便利的 Precast PAGE

RUNBLUE GELS

■蛋白質電泳是實驗室非常普遍使用的分析方法，為了節省大家寶貴的時間，並減少製備過程可能造成的危害(丙烯醯胺單體有神經毒性/ SDS 粉末吸入肺部會引起呼吸困難)，創世紀生技公司非常貼心的為大家準備了符合各式需求的預鑄膠片 **EXPEDEON RUNBLUE GELS**。



RunBlue gels 的優點：

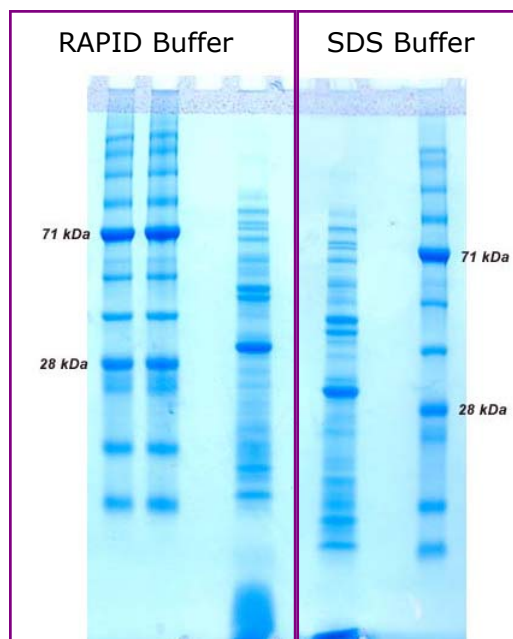
1. 高達兩年的保存期
2. 高膠片強度，避免撕裂，且不需工具輔助，可輕易取出膠片。
3. 樣品槽容積大：12well 可注入高達 35 μ l 的樣本溶液。
4. 焦集膠體有顏色標定，使樣本注入更容易：SDS=Red/Native=Green。
5. 無齒槽模，避免取出時造成樣品槽破壞。
6. 全長的分離膠體，提高解析度。
7. 10cm x 10cm or 8cm x 10cm 的膠片，適用於大部份的電泳槽。
8. 再現性高，無毒性。
9. 更經濟實惠的價格。



■ RunBlue gel 有兩種，分別是 SDS-PAGE 及 Native-PAGE，並再細分為固定濃度及梯度濃度。針對 SDS-PAGE 搭配兩種 Running Buffer — (1).RunBlue SDS Running Buffer (2).RunBlue RAPID Running Buffer，使用者可依其實驗需求做選擇。

1.RunBlue SDS Running Buffer：is a Tris-Tricine buffer system，其分離效果類似於常見的 MOPS buffer system，對於分離大分子量的蛋白質效果佳。

2.RunBlue RAPID Running Buffer：is a Tris-MOPS buffer system，其分離效果類似於常見的 MES buffer system，對於分離小分子量的蛋白質效果好。



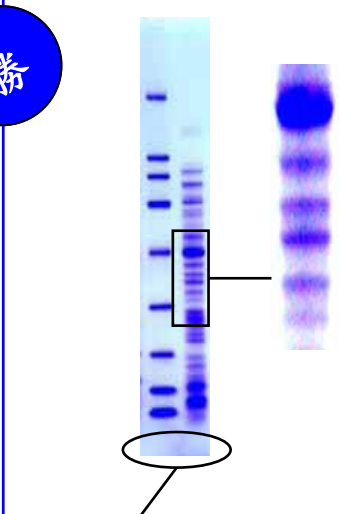
10-20%RunBlue SDS-PAGE

RunBlue gel 的優勢

解析度佳

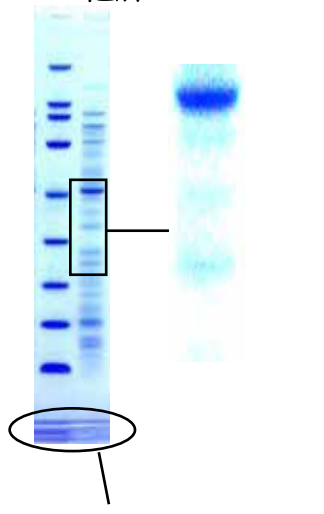
RunBlue 4-20% SDS

勝



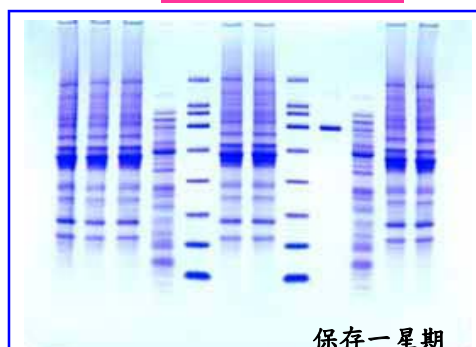
gel immediately ready for blotting or drying

他牌 4-12%



"foot" from side slot must be cut off to blot or dry

穩定度佳



保存一星期

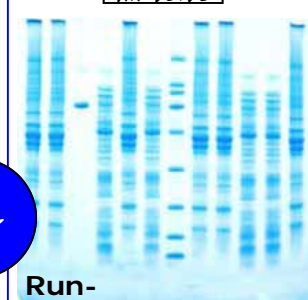
保存一年

強度更強不易裂



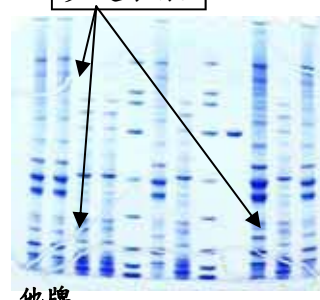
勝

無裂痕



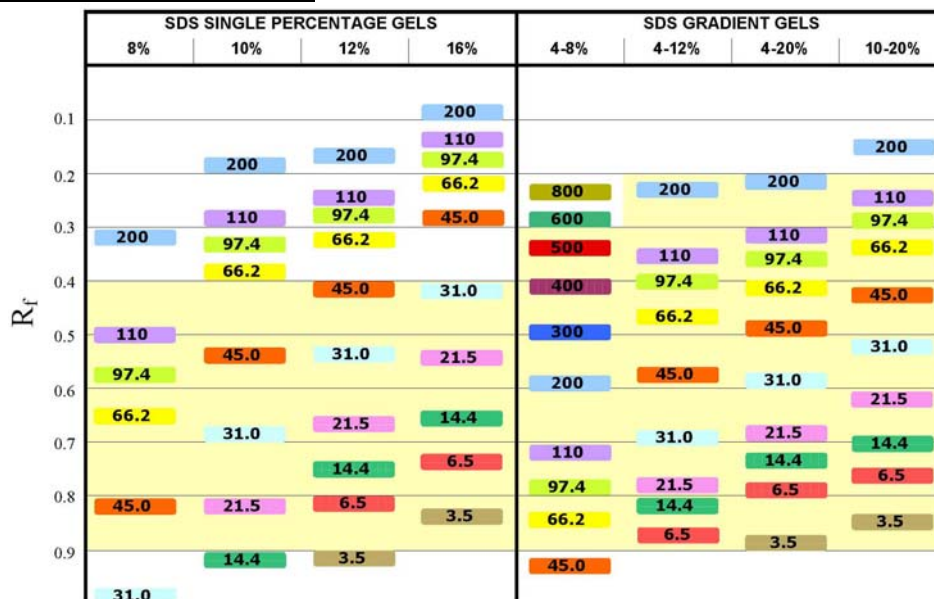
Run-

多處裂痕



他牌

Gel selection charts



產品訂購資訊

SDS-PAGE(10X10cm)- for Invitrogen & Hoefler

Acrylamide Concentration	1 Well	2 Well	12 Well	17 Well
6%	NXG00601	NXG00602	NXG00612	NXG00627
8%	NXG00801	NXG00802	NXG00812	NXG00827
10%	NXG01001	NXG01002	NXG01012	NXG01027
12%	NXG01201	NXG01202	NXG01212	NXG01227
16%	NXG01601	NXG01602	NXG01612	NXG01627
20%	NXG02001	NXG02002	NXG02012	NXG02027
4-8%	NXG40801	NXG40802	NXG40812	NXG40827
4-12%	NXG41201	NXG41202	NXG41212	NXG41227
4-20%	NXG42001	NXG42002	NXG42012	NXG42027
10-20%	NXG82001	NXG82002	NXG82012	NXG82027



新品發佈

8X10 cm SDS precast gel for Bio-Rad

Acrylamide concentration	12 well / 17well
8%	BCG00812 / BCG00827
12%	BCG01212 / BCG01227
4 - 20%	BCG42012 / BCG42027

NATIVE-PAGE(10X10cm)- for Invitrogen & Hoefler

Acrylamide Concentration	1 Well	2 Well	12 Well	17 Well
10%	NXN01001	NXN01002	NXN01012	NXN01027
20%	NXN02001	NXN02002	NXN02012	NXN02027
2-8%	NXN20801	NXN20802	NXN20812	NXN20827
3-20%	NXN32001	NXN32002	NXN32012	NXN32027



超快速蛋白質染色-只要 15 分鐘的超級染劑

Instant**BLUE**

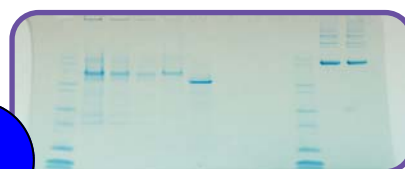
1. 超快速：**15分鐘內**完成染色
2. 只要一個動作：不需沖洗、固定、微波去染；只需將膠片置入 InstantBlue 中即可
3. 靈敏度高：可偵測 **5-25ng** 的蛋白質
4. 背景值低：不用擔心過染
5. 無毒性，無甲醇
6. 可做定量分析
7. 可上 MS 分析



■電泳後的膠片常利用染劑來觀察樣本蛋白質的位置。常用的染色方法有 Coomassie Brilliant Blue-R250 Stain(CBR)及 Silver Stain。Silver Stain 是利用銀銨錯離子與蛋白質的 COO⁻ 結合後，再使銀離子還原成深褐色的金屬銀而呈色，雖然靈敏度高，但操作過程十分繁雜；而 CBR stain 則是利用 CBR 分子上的芳香苯環與蛋白質的疏水區結合，並利用亞硫酸基團與蛋白質的正電荷結合而呈現藍色的蛋白質色帶，是最常用的染色方法。InstantBlue 即是以 Coomassie[®] stain 為基質所發展的染劑。

Ready to use-讓你省時又省力

	傳統 CBR Stain	Instant Blue
Wash before staining	v	x
destain	v	x
Non toxic and easily disposed	x	v
True single step staining	x	v
Total operation time	4hr	15min

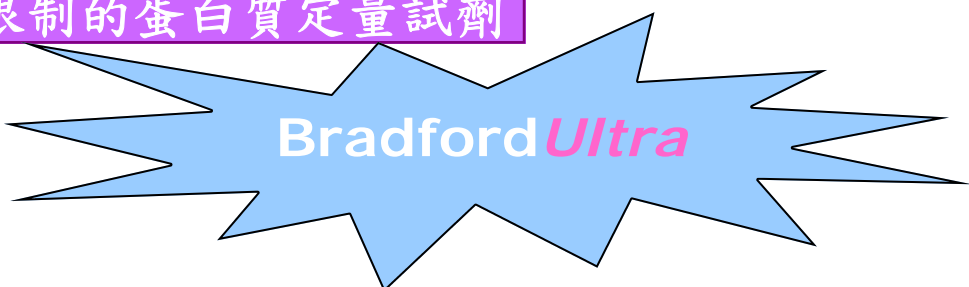


勝

產品訂購資訊

Catalogue Number	Description	storage	Shelf Life
ISB1L	InstantBlue, 1Liter	+4°C	1 year from receipt

不受多種因子限制的蛋白質定量試劑

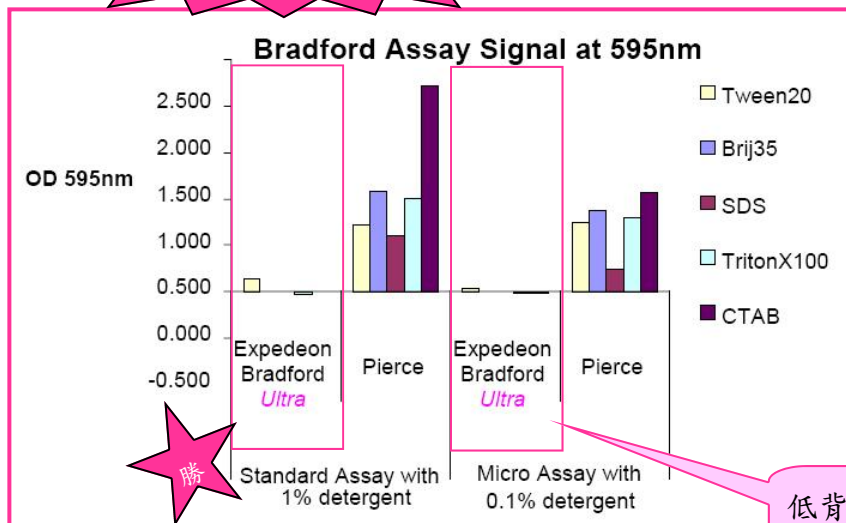


1. 不受各種 reducing agents, detergents, chelators, amines 的干擾。
2. Ready to use。

定量方法	靈敏度	原理	其他說明
Braford Ultra	0.001-0.025mg	利用 CBG-250 與蛋白質結合變藍色的特性來定量	呈色快，不受多種化學物質、detergent 影響 
Braford	0.01-0.05mg	利用 CBG-250 與蛋白質結合變藍色的特性來定量	呈色快，不受多種化學物質影響 (ex.EDTA、β-ME)，但受 detergent 影響
Biuret	0.05-5.0mg	利用銅離子與蛋白質骨架上的-C=O 基團結合來定量	呈色快，有腐蝕性，銨離子干擾大 (如 Tris、硫酸銨)
Lowry	0.05-0.5mg	是 Biuret 法的延伸，進一步加入含有磷鉬酸與磷鎢酸的 Folin reagent 對 Tyr 吸附呈色(blue)來定量	呈色慢，多種離子有干擾
BCA	0.02-0.5mg	似 Lowry 法，以 bicinchoninc acid 取代 Folin reagent	呈色快，受螯合劑(EDTA、EGTA)，還原劑(DTT、β-ME)和脂類影響，不受 detergent(如 SDS、Triton X-100、Tween)影響
UV asobance	0.05-2.0mg	利用蛋白質芳香族胺基酸在 280nm 波長有吸收作用來定量	樣本可回收，其他物質干擾大

■ 目前市面上常用的 Braford、BAC 方法受多種 detergent、螯合劑、還原劑的影響，導致蛋白質定量不準確而影響實驗的再現性。Brafold Ultra 是一個以 Coomassie Brilliant Blue 為基礎的檢測方法，即使在高達 1% detergent 存在下，也能快速精準的檢測蛋白質濃度，同時克服了 Braford、BCA 使用上的缺點。

界面活性劑的干擾?

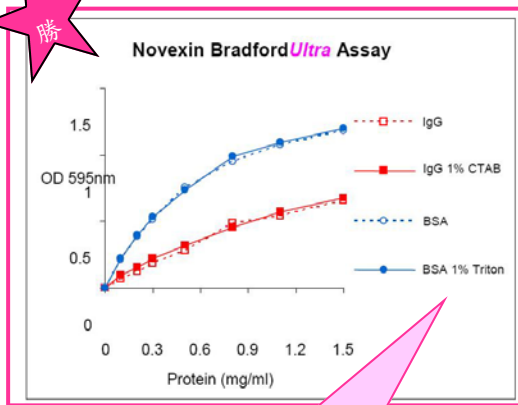


• Bradford *Ultra* 不受各 detergent 的影響，大大減少背景值的干擾。

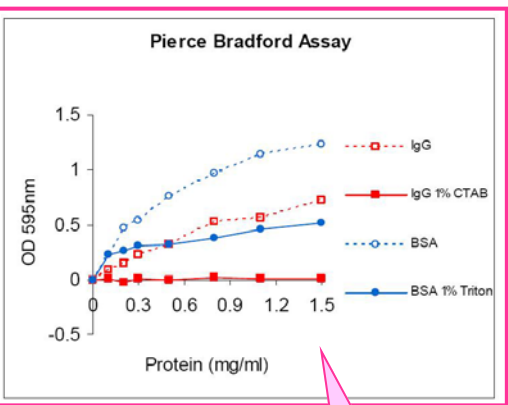
勝

低背景值干擾

勝



可信度高的標準曲線



變異大

Bradford Ultra 的使用：

- For high protein range(0.1mg/ml-1.5mg/ml) sample:reagent = 1:15
- For low protein range(1µg/ml-25µg/ml) sample:reagent = 1:1

產品訂購資訊

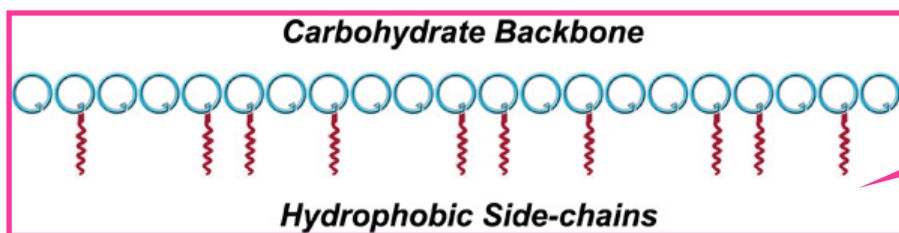
Catalogue Number	Description	storage	Shelf Life
BFU05L	BradfordUltra, 500ml	+4°C	1 year from receipt
BFU1L	BradfordUltra, 1Liter	+4°C	1 year from receipt



幫你的蛋白質穿上防護衣

1. 幫助蛋白質 refolding
2. 穩定蛋白質
3. 避免蛋白質 aggregate，增加溶解度
4. 提高蛋白質的回收率
5. 改善純化步驟
6. 適用於各種分析蛋白質的方法, ex. MS, NMR

NVoy 的結構



蛋白質的金縷衣—
NVoy

NVoy 的特性

1. NVoy 是一個 5kDa 線形聚合物，不會破壞蛋白質的結構，亦不會 block 蛋白質的活性區。(如上圖)
2. NVoy 是一個不帶電荷的兩性物質，是 pH-independent，因此適用於各種蛋白質的純化方法。

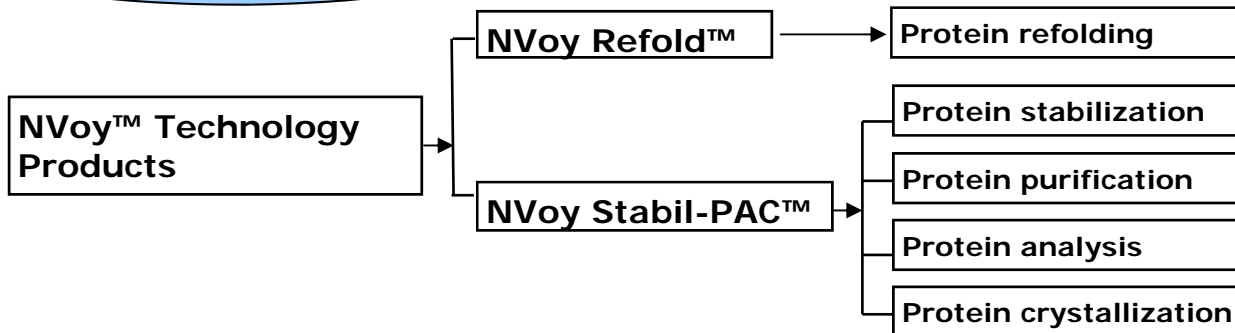
NVoy 與蛋白質的交互作用

The diagram illustrates the interaction of NVoy with protein hydrophobic patches. On the left, protein subunits with red hydrophobic patches are shown aggregating. In the middle, NVoy molecules (blue circles with red wavy lines) are shown. On the right, NVoy molecules are bound to the protein surface, preventing aggregation.

一般狀況下，蛋白質間的疏水區會進行交互作用而產生沉澱，或造成蛋白質表面非專一性的結合。

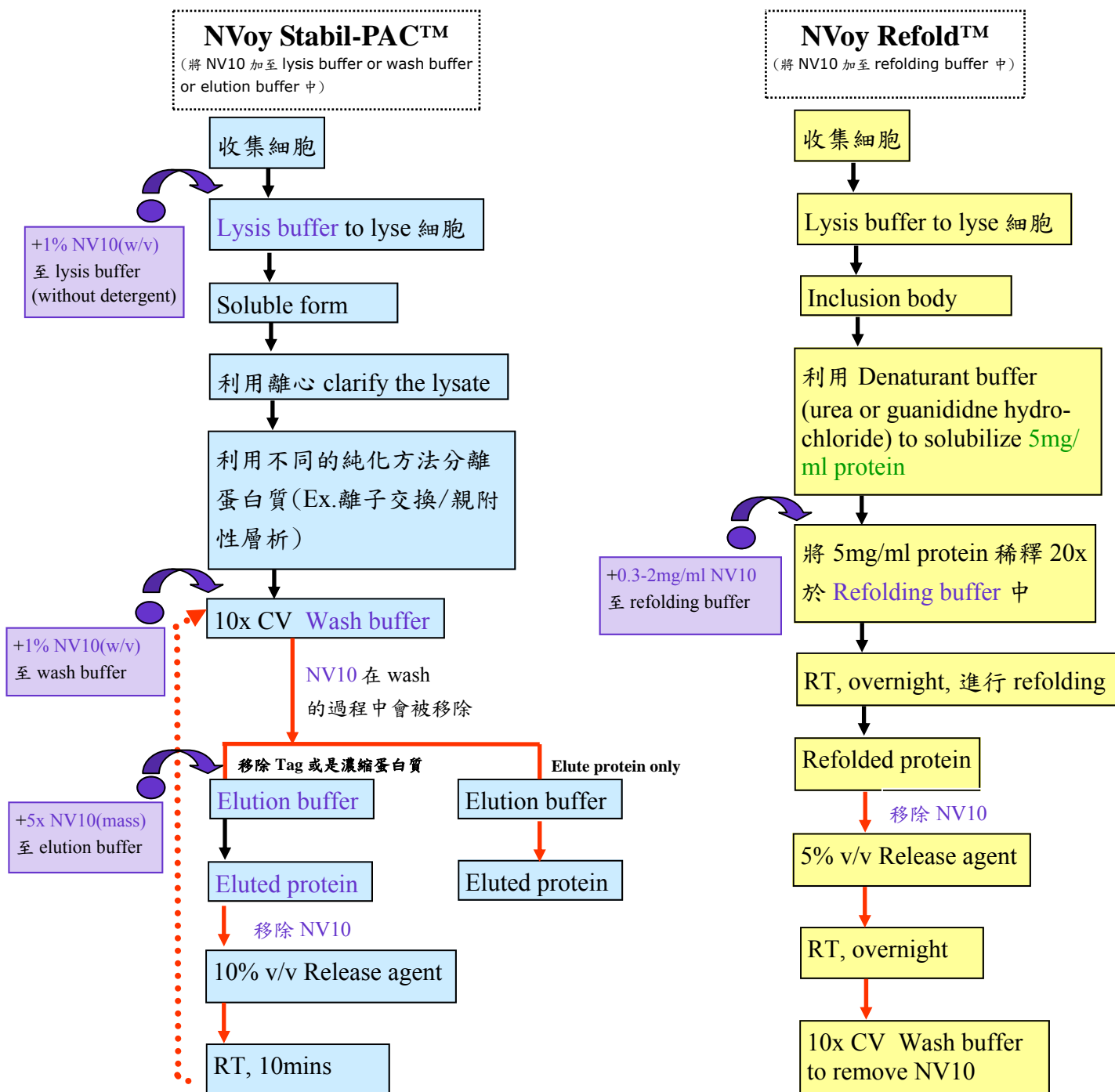
NVoy 藉由疏水性的側鏈與蛋白質的疏水區結合，再利用親水性的骨架來增加在水溶液中的溶解度，來避免蛋白質的沉澱或表面非專一性的結合。

NVoy 技術上的應用



● NV10

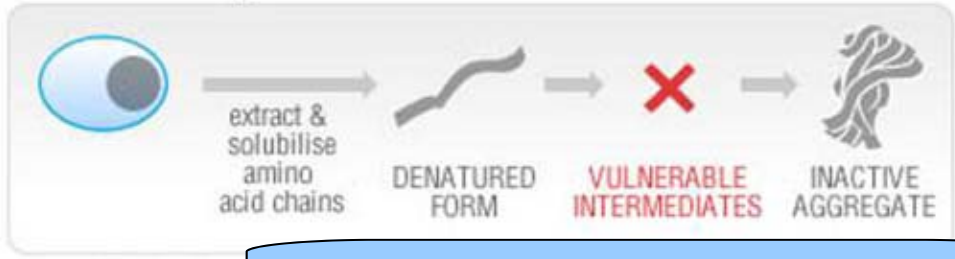
NVoy 使用流程簡圖



NVoy Refold™ Kit - 幫助 protein refolding

1. 提高 refolding 成功率
2. 不需浪費時間測試 refolding 條件
3. 提高具生物活性蛋白質的回收量

- NVoy



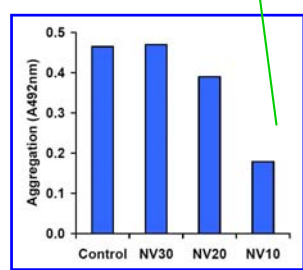
NVoy 能穩定中間產物，使做正確的摺疊，而提高具生物活性的蛋白質回收率

+ NVoy

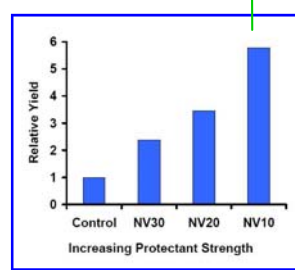


Case study of GFP

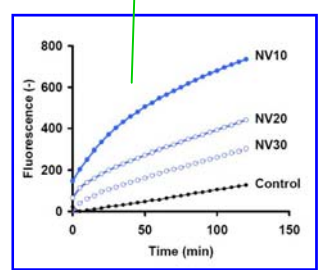
抑制 aggregation > 60%



回收量增加 5 倍



活性提高 5 倍



NV10-2.5mg/ml
NV20-1mg/ml
NV30-0.25mg/ml

Unpurified inclusion bodies 先利用含有 GnHCL 的 denaturation buffer(6M GnHCL, 50mM MES, pH 5.5)溶解。再利用含有 NVoy 的 refolding buffer(50mM Tris buffer, pH 8.0)使 Denatured protein(4.9mg/ml)進行 refolding。

產品訂購資訊

Catalogue Number	Description	storage	Shelf Life
RSK	Refold Starter Kit to refold 5mg protein (40mg NVoy)	+4°C	1 year
RM20	Refold Master Kit to refold 20mg protein (160mg NVoy)	+4°C	1 year

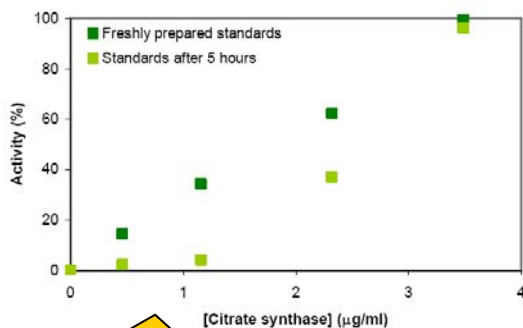
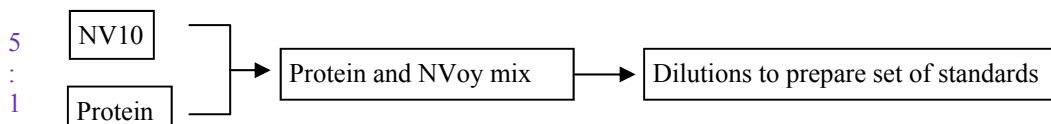


NVoy Stabil-PAC™ Kit - 幫助 protein stabilisation

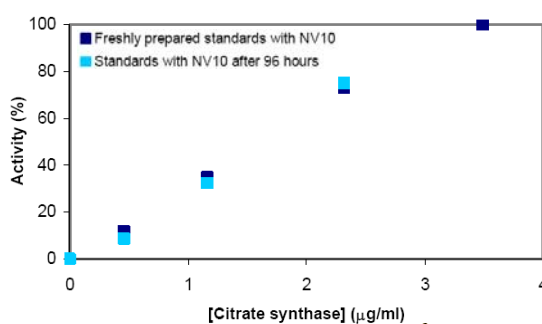
1. 保持經過反覆冷解凍的蛋白質活性
2. 延長蛋白質的保存時間
3. 維持蛋白質的溶解度
4. 避免高濃度蛋白質的集聚

★維持 enzyme 的活性

Ratio (mass)

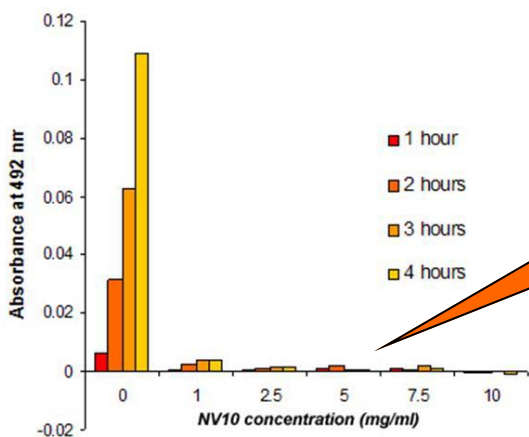
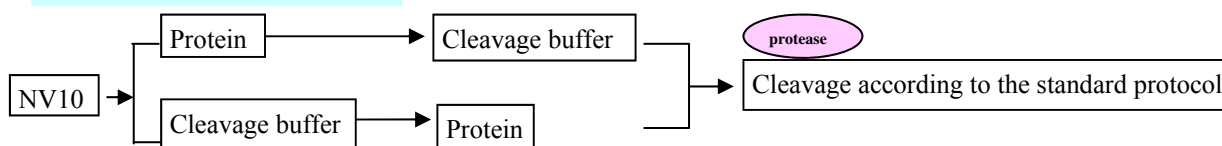


Citrate synthase 經過 5hr 後活性降低，使標準曲線再現性差。



Citrate synthase 加上 NV10，即使在 96hr 後，亦能維持良好的活性！標準曲線再現性佳。

★維持蛋白質的溶解度



NVoy 大大改善 k-MBP 在 tag 移除後蛋白質的聚集現象

▪ Fusion protein 通常是用來增加表現量、溶解度，及改善純化步驟。當 tag 被移除往往導致蛋白質的聚集及流失。而 NVoy 的使用可以改善此現象。

Aggregation (RT,4hr)
after tag cleavage of 1mg/ml k-MBP

NVoy Stabil-PAC™ Kit - 應用於 protein purification

1. 去除 endotoxin
2. 減少蛋白質的流失
3. 改善純化方法
4. 提高蛋白質的純度

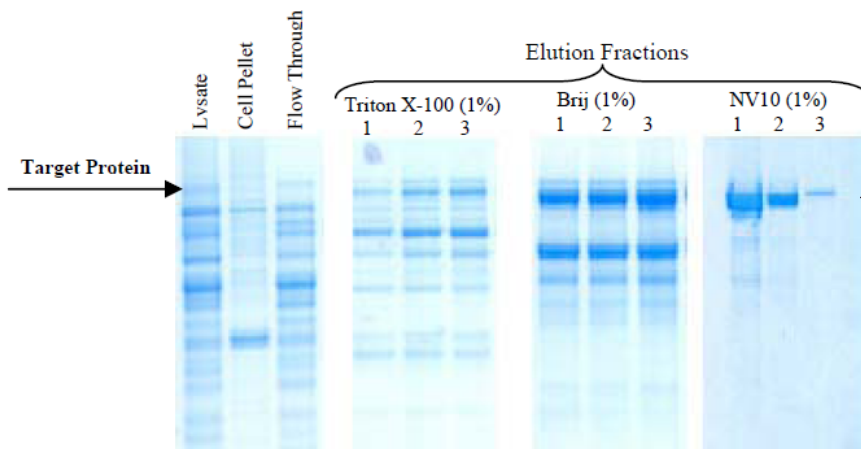
★有效去除 endotoxin

Method	Protein Yields (% Control)	Endotoxin (EU)	Activity (% Control)
Control	100	120000	100
Detoxi Gel	32	3000	55
Triton X114	45	80	32
NVoy	78	Non Detected	72

NVoy 有效去除 endotoxin，並減少蛋白質的流失。

★提高蛋白質的純度

■ Comparison of protein processing using NV10 vs. detergents



在 protein processing 的過程中，NV10 的使用比 detergent 能得到純度更佳且具活性的蛋白質。

★避免純化過程所造成的蛋白質流失

- 蛋白質的純化是一耗時、多步驟的過程，一連串緩衝液的沖洗、置換、濃縮，往往導致大量蛋白質的流失，造成後續分析的困難。

Initial protein concentration	Recovered protein (% yield)
10 µg/ml β-lactoglobulin	77%
10 µg/ml β-lactoglobulin + 10 µg/ml NV10	85%
10 µg/ml β-lactoglobulin + 100 µg/ml NV10	100%

NV10 可以降低透析過程所造成蛋白質流失的現象，以提高回收率。

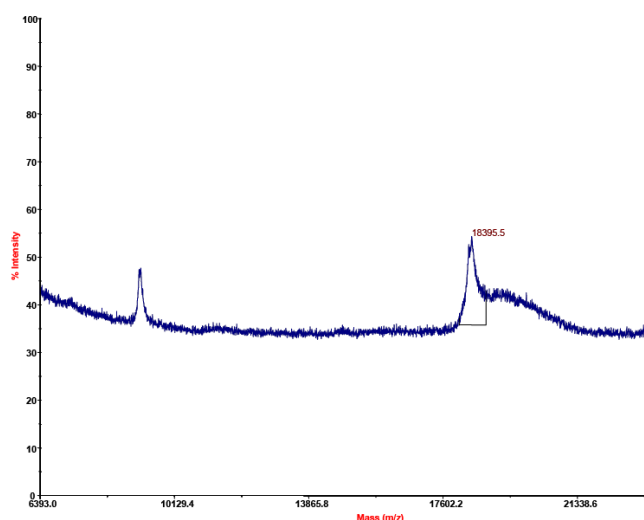
2 ml 的 sample loading 至 Pierce Slide-A-Lyser dialysis cassette · dialysis

NVoy Stabil-PAC™ Kit - 應用於 protein analysis

1. 可應用於 MS, CD, Crystallisation... 等結構的分析
2. 應用於 HTS assay, 保持蛋白質的可溶性並降低 non-specific binding
3. 取代不易被移除且影響分析的 detergents

★應用於 MS 分析

Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI)



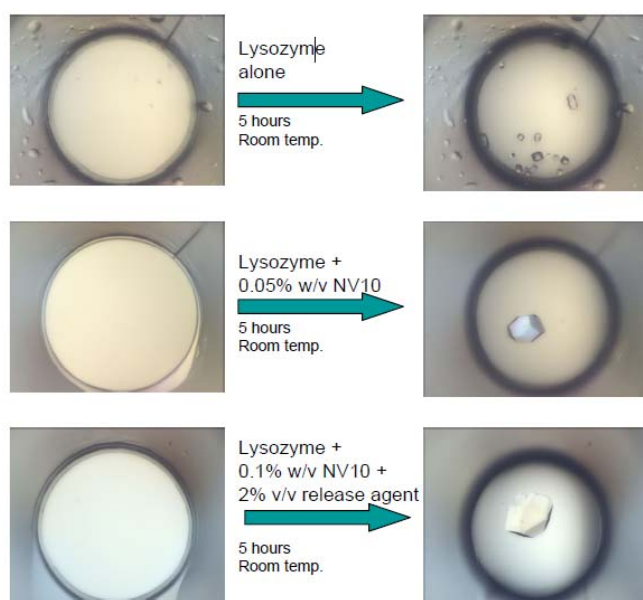
Maldi MS spectra of 0.1 mg/ml protein samples (5 μ M), containing NV10 (1x stock) were acquired on an ABI 4700 Proteomics Analyser with TOF/TOF optics. The mass range m/z 6000 - 23000 was analysed.

The protein sample was run in an α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix (10 mg/ml in 50% MeOH:water).

The aqueous protein sample was mixed in a 1 to 1 ratio with the matrix solution.

The protein ionised well in the presence of NV10 (1x stock) and a well defined protein peak was observed at 18.4 kDa, which corresponds to the mass of β -Lactoglobulin.

★應用於 Crystallography 分析



■ 蛋白質的分析過程往往需要高度濃縮的蛋白質溶液，NVoy 可以有效提供蛋白質的穩定度及溶解度，有助於後續分析。

■ A 1 mg/ml solution of NV10 is compatible with many analytical techniques

<u>Protein Concentration</u>		<u>Column Chromatography</u>	
BCA Assay	✓✓✓	IMAC	✓✓✓
Bradford Assay*	✓✓	Ion Exchange	✓✓✓
UV spectroscopy	✓✓✓	Reversed Phase***	✓✓
<u>Protein Structure</u>		<u>Protein Activity</u>	
Biacore	✓✓	Cell Based Assays	✓✓✓
Circular Dichroism	✓✓✓	ELISA Assays	✓✓✓
Crystallography	✓✓	FRET assays	✓✓✓
Electrophoresis	✓✓✓		
Mass spectrometry**	✓✓✓		
NMR	✓✓		

* Use a blank containing NV10. NV10 will give a weak Bradford signal. The assay will show a reduced sensitivity for protein concentrations lower than 0.25 mg/ml. Use Expedeon's Bradford *ULTRA* Assay for higher sensitivity and less background interference.

** Standard C4 zip tip clean up recommended

*** Use of guard column recommended

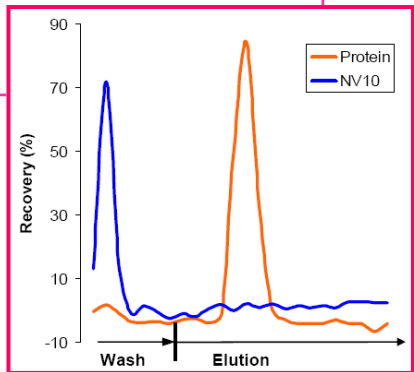
■ 移除 NVoy - 絲毫不費力

方法一：利用離子性交換層析或吸附性層析，在 wash 的步驟中輕鬆去除。

方法二：利用 release agent*，減弱 NVoy 與 target protein 之間的交互作用力，再利用方法一，於 wash 的步驟中輕鬆去除。

*weak release agent:DMSO

*strong release agent:NV10 removal solution



產品訂購資訊

Catalogue Number	Description	storage	Shelf Life
STP	Stabil-PAC, contains 6x10mg NVoy & Release agents- sufficient to work with at least 12mg protein	Ambient	1 year
STP-MX	Stabil-PAC MAXI, contains 6x40mg NVoy & Release agents- sufficient to work with at least 48mg protein	Ambient	1 year

