科凌生物
Coling Biotech

武汉科凌生物技术有限公司
技术服务手册

微信公众号

联系我们

武汉科凌生物

目 录

分子生物学服务

1. 序列扩增 p3
2. 全基因合成 p4
3. 质粒全长测序(Nanopore 三代测序技术) p5
4. 载体构建 p6
5. 序列定点突变 p7

蛋白及互作相关服务

6. 亚细胞定位 p8-9
7. 转录因子活性检测 p10-11
8. 启动子活性检测 p12-13
9. 荧光素酶互补实验（Spilt-luc） p14
10. 双分子荧光互补实验（BiFC） p15-16
11. GST pull down 实验 p17-18
12. 免疫共沉淀（Co-IP/IP-MS） p19-20
13. 酵母单双杂交文库构建及筛选（核） p21-22
14. 酵母双杂交文库构建及筛选（膜） p23-24
15. 酵母双杂交互作验证（核体系） p25-26
16. 酵母双杂交互作验证（膜体系） p27-28
17. 酵母三杂交互作验证 p29-30
18. 酵母单杂交互作验证 p31-32
19. 双荧光素酶报告检测实验（Dual-luc） p33-34
20. 染色质免疫共沉淀（ChIP-seq/ChIP-PCR） p35
21. 凝胶阻滞实验（EMSA） p36-37
22. 蛋白 WB 检测 p38
23. 蛋白磷酸化检测 p39
24. 蛋白泛素化检测 p40-41

检测类相关服务

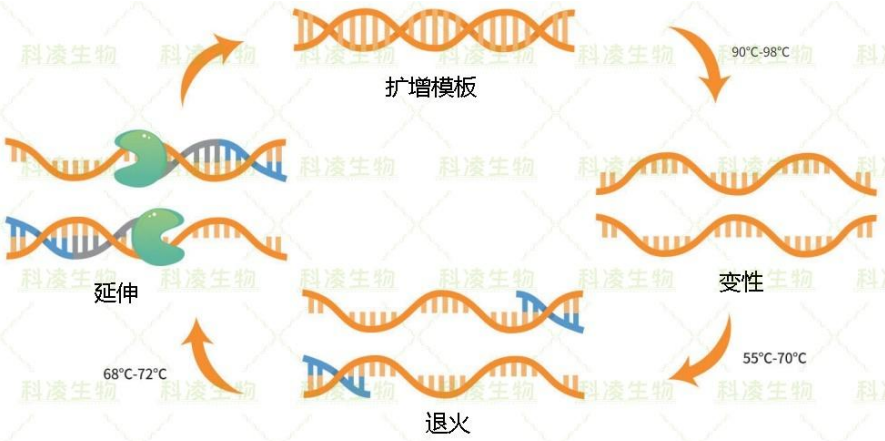
25. 荧光定量 PCR 检测基因表达量（相对/绝对） p42
26. 转基因插入拷贝数检测（Southern Bolt） p43
27. 植物组织 GUS 染色及活性检测 p44
28. 植物 VIGS 实验及生理指标检测 p45
29. 植物胁迫处理及生理指标检测 p46-47
30. 项目合作与课题设计 p48

武汉科凌生物

1 序列扩增

技术简介：

序列扩增分析的核心原理是通过聚合酶链式反应（PCR）技术，对目的序列片段进行特异性的扩增和测序，以分析研究物种中目的基因的核苷酸序列和多样性。原理图如下：



应用范围：

1、分析物种中目的基因和启动子的实际序列；

2、分析野生型和突变型序列的差异位点；

3、分析不同研究品种间的核酸序列差异位点。

公司优势：

1、不同植物基因组和 RNA 提取方法，保证扩增模板的纯度，提高扩增成功率；

2、多种高保真酶同时，保证高效的扩增效率；

3、扩增片段可直达功能载体，省去后续载体构建流程

4、本司技术人员完成过数十物种的基因扩增，具有丰富的扩增经验。

服务流程：

序列审核—订单确认—序列扩增—载体构建—测序验证—质粒出库。

结果交付：

包含三个克隆的载体测序 sqd 文件、测序 seq 文件（超过部分 100 元/克隆）；

包含扩增序列的载体：质粒溶液 50μl（小提）、甘油菌 1ml（大肠）。

送样要求：

老师提供新鲜材料（>2g/样品），用于 DNA 提取冰袋寄送，RNA 提取干冰寄送；

老师提供需要扩增的目的序列和使用载体。

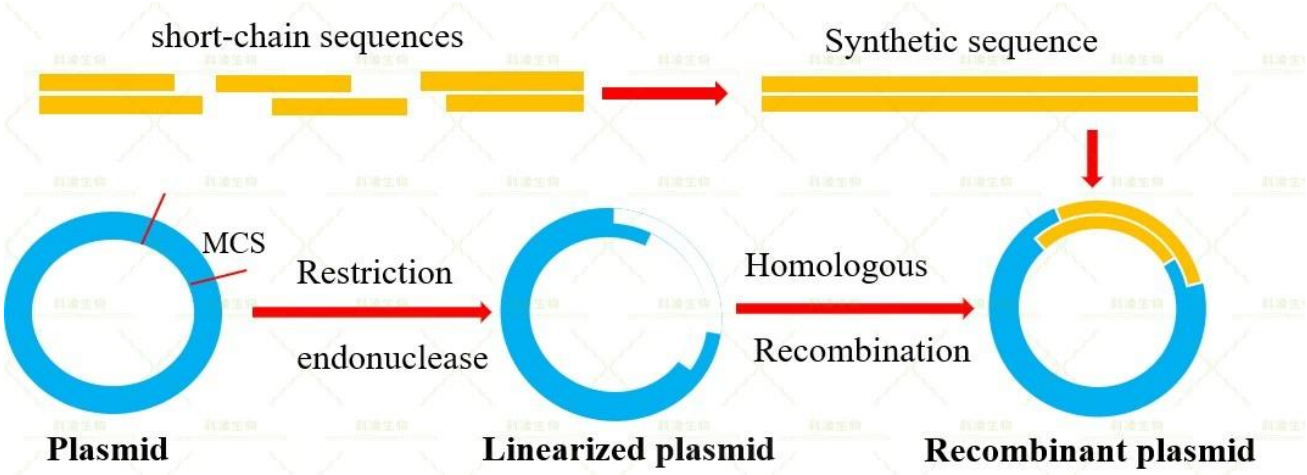
本司服务案例：

本司已完成多个物种复杂组织启动子和基因的扩增，包括种子（水稻、拟南芥、烟草、玉米、油菜、油莎豆、枸杞等），果实（番茄、柑橘、苹果、葡萄、芒果、菠萝、哈密瓜、香蕉、蓝莓、油茶、枇杷等），块茎（马铃薯、西洋参、木薯、山药、天麻等），茎段（甘蔗、杨树、楸树、猕猴桃、西瓜等），花朵（新疆扁桃、蝴蝶花、石斛兰、月季、玫瑰、桂花、百合等），树皮（橡胶树、杨树、楸树、小桐子等），叶片（睡莲、白菜、 桑树、银杏等）。

2 全基因合成

技术简介：

基因合成是指利用化学方法合成一段完整的 DNA 双链，通常是将短的核苷酸序列逐步合成长链 DNA。目前该技术主要应用在人工序列改造、调控元件的设计及针对不同物种表达的蛋白密码子优化上，可以帮助研究人员快速高效的获取目的序列。原理图如下：



应用范围：

1、目的蛋白表达序列需要密码子优化；

2、研究物种中已知序列却无法正常扩增获得；

3、目的序列需要突变；

4、人工设计序列等。

公司优势：

1、引物合成和测序技术平台，保证实验完整和高效性；

2、三代 Nanopore 测序平台，缩短长序列合成测序周期；

3、丰富的载体库，使得合成序列直接到达功能载体，缩短亚克隆时间。

服务流程：

序列审核—订单确认—序列合成—载体构建—测序验证—质粒出库。

结果交付：

包含合成序列的完整载体图谱、注释信息、测序 sqd 文件、测序 seq 文件；

包含合成基因的载体：质粒溶液 50μl（小提）、甘油菌 1ml（大肠）。

送样要求：

老师提供需要合成的目的序列和使用载体。

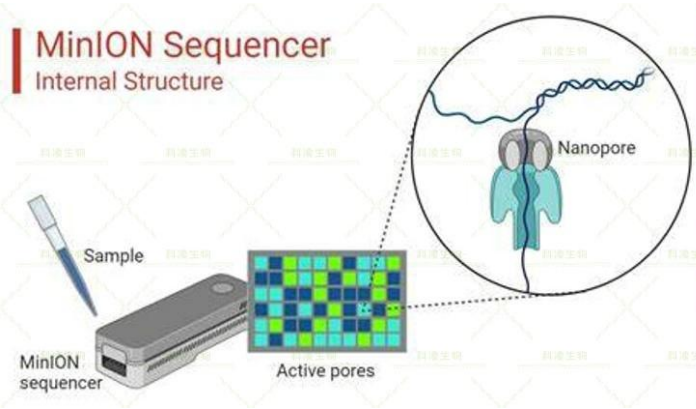
本司服务案例：

本司质粒包括植物超表达、敲除、干扰、VIGS、亚细胞定位、双分子荧光互补、荧光素酶互补、荧光素酶活性、酵母单双杂交、各种标签载体等丰富的载体库，可以任意选择构建，质粒信息详见质粒库。

3 质粒全长测序

技术简介：

质粒是分子操作中重要组成部分，而在科研人员使用过程中，经常受困于质粒序列信息的缺失或序列突变，本司推出最新 Oxford Nanopore 技术全质粒测序服务，具有卓越的读取质量和长度，可以获得准确而详细的质粒全长序列。原理图如下：



特点	Sanger	Nanopore
测序目的	部分序列	完整质粒序列
单次读长	<1 kb	无限制
引物要求	需要引物	无需引物
测序通量	低	高
测通时间	一夜至几天	24h内完成
全质粒或大插入片段测通	高成本	低成本

应用范围：

1、长期保存，保存标记丢失的质粒；

2、获得的质粒没有载体图谱和序列；

3、质粒多次扩繁，碱基发生突变等。

公司优势：

1、只需提供质粒或菌液，无需提供任何序列信息，即可测通质粒全长；

2、具有零信息和周期短的优势；

3、可对非单一质粒转化分离，保存正确菌种。

服务流程：

样本收取—质粒制备—Nanopore 测序—序列分析—结果交付。

结果交付：

拼接结果：fasta 格式 ；

质粒图谱：SnapGene 可直接打开的 genebank 文件；

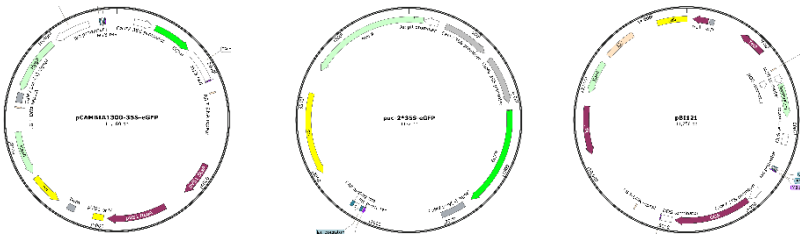
测序正确质粒和甘油菌(可选)。

送样要求：

需要新鲜或甘油菌液体积大于 0.5 ml，冰袋运输；

质粒 DNA 体积大于 20 μl，浓度不低于 30ng/μl，且主带明显无降解。

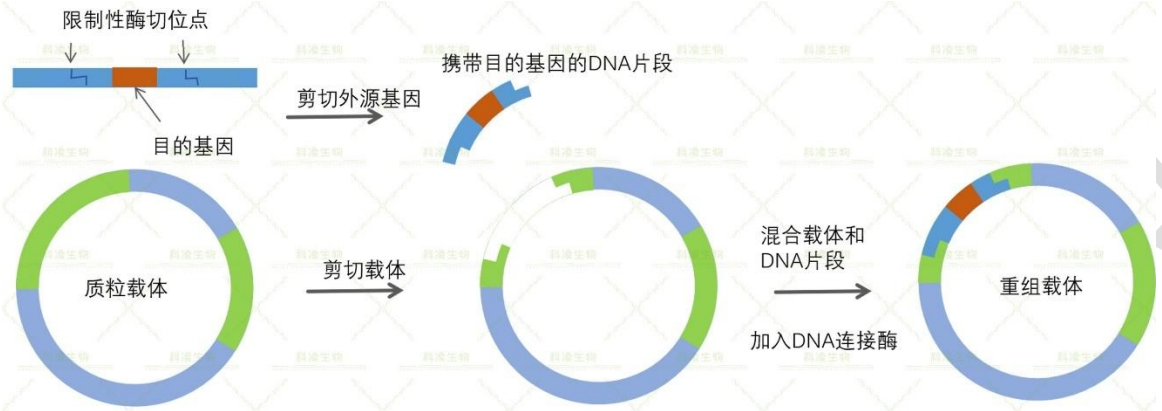
本司服务案例：



4 载体构建

技术简介：

载体构建是分子生物学研究中最常用的实验之一，其主要用于将目的序列插入到载体质粒中，并形成重组质粒分子。重组质粒通过导入宿主细胞中，可实现目的基因在宿主细胞内的表达。借助载体上的辅助元件，可使目的基因片段在宿主细胞中发挥功能。原理图如下：



应用范围：

1、蛋白功能研究：亚细胞定位、转录因子活性检测等载体；

2、启动子功能研究：荧光素酶、GUS 报告基因等载体

3、互作检测：酵母单双三杂交、BiFC、Spilt-luc 等载体;

4、蛋白表达：原核表达、GST pull down、EMSA 等载体；

5、植物转基因：基因超表达、敲除、干扰、VIGS 等载体等。

备注：详细质粒信息和使用情况见单项技术服务，或科凌生物质粒库。

公司优势：

1、我司含有丰富的载体库，并且质粒经过三代测序和功能验证，大大提高质粒可靠性；

2、我司对酶切线性质粒进行了接头处理，线性化质粒无自连，阳性率接近 100%；

3、处理后的线性化质粒可容纳大片段，提高载体构建成功率，缩短实验周期。

服务流程：

序列审核—订单确认—材料寄送—载体构建—测序验证—质粒出库。

结果交付：

包含重组质粒的完整载体图谱、注释信息、测序 sqd 文件、测序 seq 文件；

包含合成基因的载体：质粒溶液 50μl（小提）、甘油菌 1ml（大肠）；

可选服务：下游菌株转化（农杆菌、表达菌株等），质粒无内毒素提取等。

送样要求：

提供目的序列信息：目的序列需要插入的载体信息，包括序列，抗性，测序引物，克隆位点；

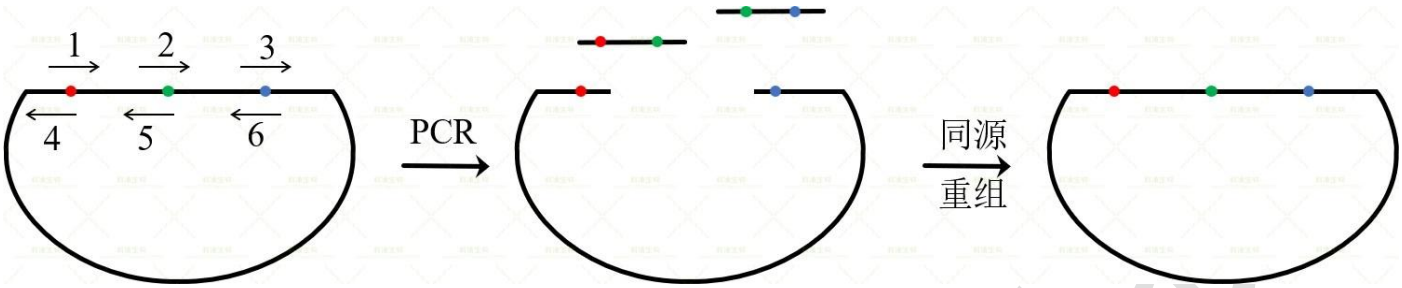
样品冰袋寄送：1、包含目的序列的模板质粒，模板质粒的抗性；2、目的载体(本司无法提供载体情况下)；3、模板质粒中包含目的基因序列这段的峰图格式测序报告(非整个模板质粒的测序报告)。

本司服务案例：

5 序列定点突变

技术简介：

定点突变是指在核苷酸序列的特定位置上发生的碱基的突变、增加或缺失等，主要目的是通过基因工程方法改变 DNA 的序列，从而是的核苷酸序列特性发生变化或翻译后的蛋白特性发生变化。原理图如下：



应用范围：

1、蛋白修饰（磷酸化、泛素化等）位点的突变；

2、启动子顺式作用元件的突变；

3、转录因子活性或结合序列的突变等。

公司优势：

1、我司含有丰富的载体库，并且质粒经过三代测序和功能验证，大大提高质粒可靠性；

2、我司对酶切载体质粒进行了接头处理，线性化质粒无自连，阳性率接近 100%；

3、处理后的线性化质粒可容纳大片段，提高载体构建成功率，缩短实验周期；

4、我司自研多片段重组试剂盒，可通过一步法将多片段连接至终载体上。

服务流程：

序列审核—订单确认—材料寄送—点突变和载体构建—测序验证—质粒出库。

结果交付：

包含重组质粒的完整载体图谱、注释信息、测序 sqd 文件、测序 seq 文件；

包含合成基因的载体：质粒溶液 50μl（小提）、甘油菌 1ml（大肠）；

可选服务：下游菌株转化（农杆菌、表达菌株等），质粒无内毒素提取等。

送样要求：

客户提供目的序列信息：目的序列及突变位点，需要插入的载体信息，包括序列，抗性，测序引物，克隆位点；

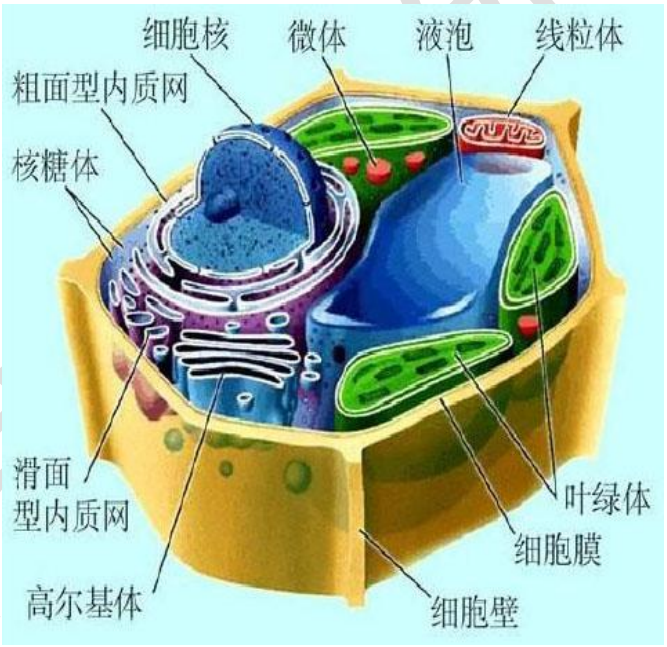
样品冰袋寄送：1、包含目的序列的模板质粒，模板质粒的抗性；2、目的载体(本司无法提供载体情况下)；3、模板质粒中包含目的基因序列这段的峰图格式测序报告(并非整个模板质粒的测序报告)。

本司服务案例：

6 亚细胞定位

技术简介：

细胞是形成生物个体的基本结构功能单位，植物细胞结构包括细胞核、细胞膜、细胞质、液泡、内质网、高尔基体、线粒体、叶绿体和过氧化物酶体等。蛋白在不同细胞结构中的定位决定了其功能，因此对蛋白质的亚细胞定位研究具有重要意义。GFP/RFP/mCherry/YFP/CFP 等荧光蛋白通常作为报告基因用于亚细胞定位检测，将荧光蛋白融合与目标蛋白的 N 端或者 C 端，通过稳定遗传或瞬时转化技术使得融合蛋白在受体材料细胞内表达，目标蛋白会牵引荧光蛋白定位于不同的细胞结构中，通过添加细胞结构定位指示剂（染料或者蛋白定位 Marker），在荧光显微镜下可观察确定目标蛋白的亚细胞定位情况。原理图如下：



应用范围：

1、蛋白在细胞中的具体定位；

2、蛋白适应环境变化的位置迁移；

3、不同蛋白之间在细胞中的位置影响等。

公司优势：

1、本司有多种用于亚细胞定位的荧光表达载体，可用于植物稳定和原生质体瞬时转化(表 1)；

2、本司有多种亚细胞定位蛋白 Marker，带有不同荧光标签且构建在不同植物转化体系载体上，定位 Marker 已在不同单双子叶植物中验证(表 2，图谱见科凌生物质粒库)；

3、本司长期种植水稻、烟草、拟南芥等幼苗，实验周期短；

4、本司可根据老师要求安排不同植物种植，并进行后续亚细胞定位检测。

表 1 蛋白亚细胞定位荧光标签质粒

质粒名称	原核抗性	启动子	标签蛋白	融合位置	宿主	用途
pCAMBIA1300-35S-eGFP	K	35S	GFP	C	植物	植物农杆菌注射亚细胞定位
pCAMBIA1300-35S-RFP	K	35S	RFP	C	植物	植物农杆菌注射亚细胞定位
pCAMBIA1300-35S-mCherry	K	35S	mCherry	C	植物	植物农杆菌注射亚细胞定位
pCAMBIA1300-35S-CFP	K	35S	CFP	C	植物	植物农杆菌注射亚细胞定位
puc-2*35S-eGFP	A	2*35S	GFP	C	植物细胞	植物原生质体转化亚细胞定位
PBI221-35S-GFP	A	35S	GFP	C	植物细胞	植物原生质体转化亚细胞定位
HBT95	A	增强型 35S	GFP	C	植物细胞	植物原生质体转化亚细胞定位
PUC-35S-eGFP	A	35S	GFP	C	植物细胞	植物原生质体转化亚细胞定位
PUC-35S-RFP	A	35S	RFP	C	植物细胞	植物原生质体转化亚细胞定位
PUC-35S-mCherry	A	35S	mCherry	C	植物细胞	植物原生质体转化亚细胞定位
PUC-35S-CFP	A	35S	CFP	C	植物细胞	植物原生质体转化亚细胞定位
PUC-35S-eYFP	A	35S	YFP	C	植物细胞	植物原生质体转化亚细胞定位

表 2 蛋白亚细胞定位 Marker 信息

标签蛋白名称	启动子	标签蛋白	来源物种	宿主	用途
H2B	35S	mCherry, CFP	拟南芥	原生质体，表皮细胞	细胞核

GHD7	35S	mCherry, CFP	水稻	原生质体，表皮细胞	细胞核
PIP2A	35S	mCherry, CFP	拟南芥	原生质体，表皮细胞	细胞膜
HSBP	35S	mCherry, CFP	拟南芥	原生质体，表皮细胞	细胞质
WAK2	35S	mCherry, CFP	拟南芥	原生质体，表皮细胞	内质网
OsSPP1	35S	mCherry, CFP	水稻	原生质体，表皮细胞	内质网
ManI	35S	mCherry, CFP	大豆	原生质体，表皮细胞	高尔基体
OsManI	35S	mCherry, CFP	水稻	原生质体，表皮细胞	高尔基体
PTS1	35S	mCherry, CFP	拟南芥	原生质体，表皮细胞	过氧化物酶体
OsAPX3	35S	mCherry, CFP	水稻	原生质体，表皮细胞	过氧化物酶体
COX4	35S	mCherry, CFP	拟南芥	原生质体，表皮细胞	线粒体
OsALDH2a	35S	mCherry, CFP	水稻	原生质体，表皮细胞	线粒体
AtTPK1	35S	mCherry, CFP	拟南芥	原生质体，表皮细胞	液泡
VAMP711	35S	mCherry, CFP	拟南芥	原生质体，表皮细胞	液泡
OsTIP	35S	mCherry, CFP	水稻	原生质体，表皮细胞	液泡

服务流程：

咨询下单—受体材料确认—实验设计—亚细胞定位载体构建—瞬时转化—拍照记录。

结果交付：

标准实验报告，包括实验步骤与结果；

目的蛋白与 Marker 共定位显微图片(附送空载体对照组)；

发表级别的组图。

送样要求：

植物组织需要活体寄送；

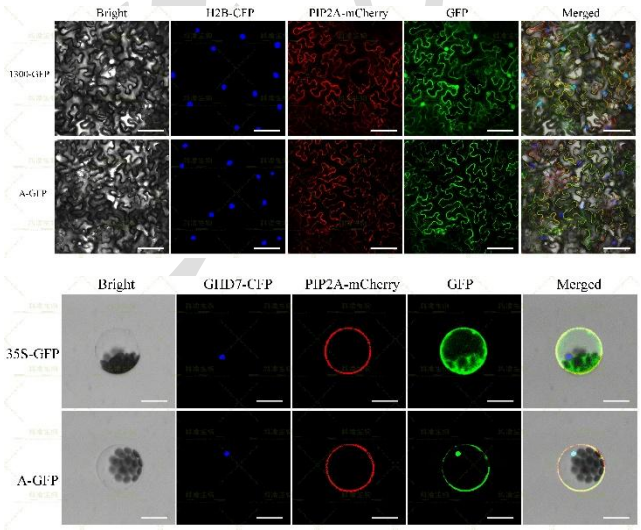
载体需要新鲜或甘油菌液体积大于 0.5 ml，冰袋运输；

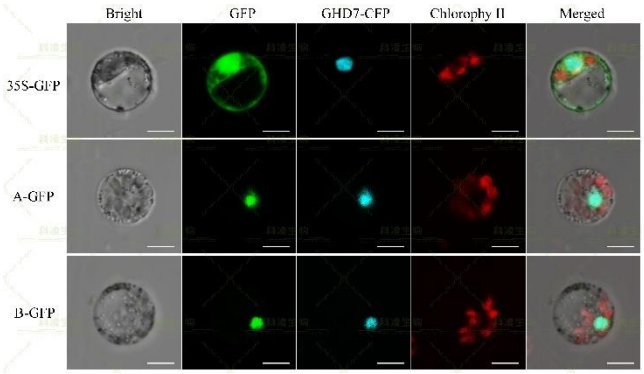
质粒 DNA 体积大于 20 μl，浓度不低于 30ng/μl,，且主带明显无降解；

提供测序结果以及抗性；

如需我司构建载体，要求详见载体构建。

本司服务案例（以烟草叶肉细胞、拟南芥原生质体、水稻原生质体为例）：





结果初析：目的蛋白连接 GFP 标签，并与带 CFP/mCherry 的细胞结构定位 Marker 共转细胞，最终判断目的蛋白的准确定位。

7 转录因子活性检测

技术简介：

转录因子（TF）是一类具有特殊结构的蛋白质，也称为反式作用因子。转录因子通过与靶基因启动子区域的顺式作用元件特异性结合，行使调控基因表达的功能，根据其功能的不同可以分为转录激活因子和转录抑制因子。在植物中，转录因子在生长发育、形态建成、响应外界环境变化等方面发挥关键的调节作用。目前，鉴定转录因子激活/抑制活性的方法主要有酵母和植物细胞双荧光素酶检测系统。在酵母系统中，单独的 BD 蛋白可以与 GAL4 上游活化序列结合，但不能引起转录。然而，将一段具有转录激活活性的转录因子构建到 BD 载体上，若其表达产生的 BD 蛋白单独与 UAS 结合也可以引起下游报告基因的转录，那么就称之为酵母双杂交的自激活现象。反过来，可以利用这种自激活现象来验证某个转录因子是否具有转录激活活性。在植物系统中，将转录因子构建至含有 GAL4 结合域的载体上，随后与含有 GAL4 调控序列启动的荧光素酶表达载体共转，最后通过荧光素酶活性的变化以判断转录因子的激活/抑制活性。在检测时，可让目的蛋白与转录激活子 VP16 形成融合蛋白，通过报告基因活性的变化进一步判断转录因子的激活/抑制活性。原理图如下：（左侧酵母系统系统，右侧植物系统）

应用范围：

1、 转录因子激活结构域确定；

2、植物转录因子激活/抑制活性的检测。

公司优势：

1、本司有整套的酵母系统和植物表达系统质粒；

2、本司植物表达系统为高拷贝小骨架质粒，可以高效转化不同植物原生质体，从而提高荧光素酶检测数值，增加数据可靠性；

3、本司自研原生质体转化试剂盒可兼容多种植物原生质体制备和转化，使得检测可以在研究物种中进行。

服务流程：

咨询下单—确定实验信息—载体构建—酵母转化—β-半乳糖苷酶活性检测—结果交付。

咨询下单—确定实验信息—载体构建—植物原生质体—荧光素酶活性检测—结果交付。

结果交付：

标准实验报告，包括实验步骤与结果；

酵母系统： 酵母平板图，β-半乳糖苷酶活性检测柱状图(附送阴阳性对照组)；

植物系统： 荧光素酶检测实验数据及分析柱状图(附送阴阳性对照组) ；

发表级别的组图。

送样要求：

植物组织需要活体寄送；

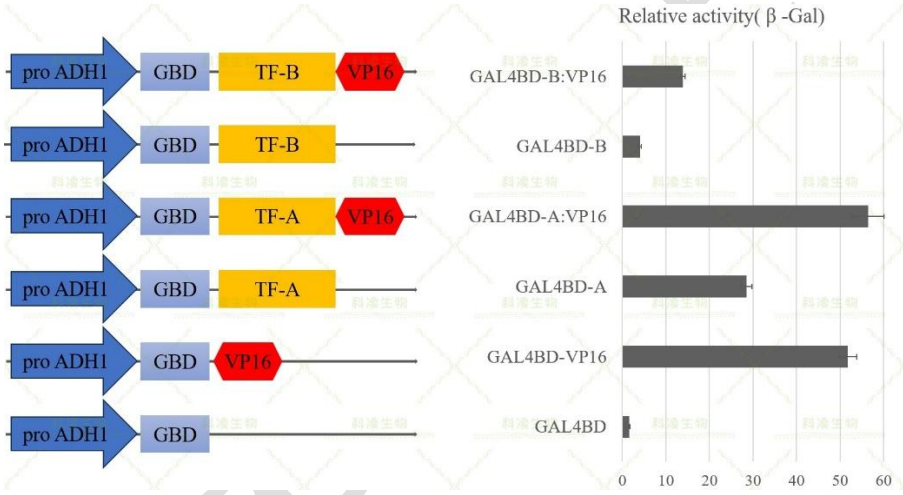
载体需要新鲜或甘油菌液体积大于 0.5 ml，冰袋运输；

质粒 DNA 体积大于 20 μl，浓度不低于 30ng/μl,，且主带明显无降解；

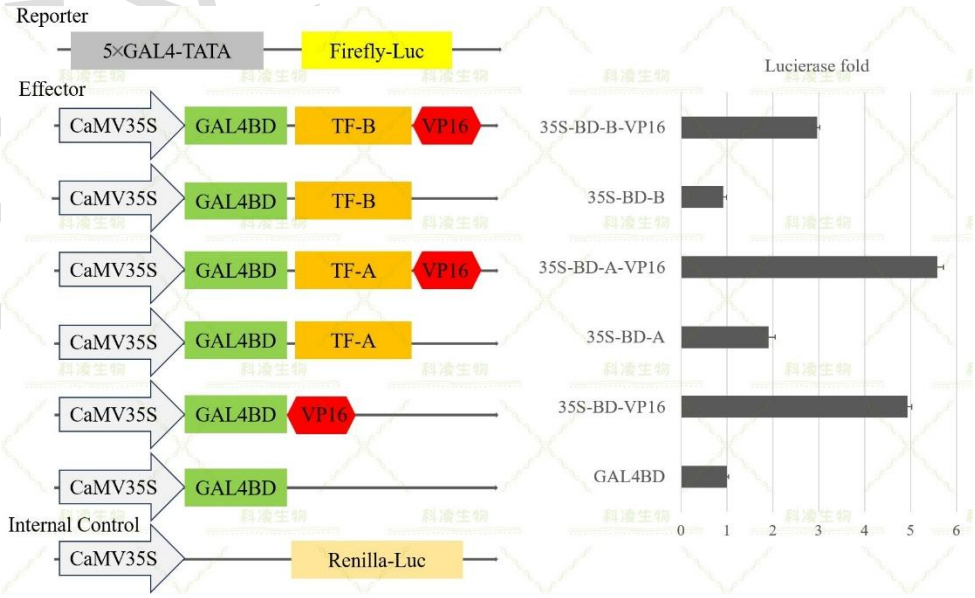
提供测序结果以及抗性；

如需我司构建载体，要求详见载体构建。

本司服务案例（以酵母、植物细胞为例）：



结果初析：目的蛋白单独和融合 VP16 后分别转化酵母，并分析 α-半乳糖苷酶活性。检测结果显示 A 蛋白为转录激活子，B 蛋白为转录抑制子。

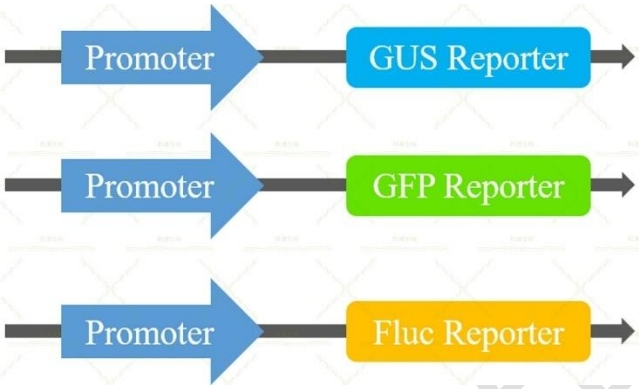


结果初析：目的蛋白单独和融合 VP16 后分别转化拟南芥原生质体，并分析荧光素酶活性。检测结果显示 A 蛋白为转录激活子，B 蛋白为转录抑制子。

8 启动子活性检测

技术简介：

启动子是位于结构基因 5'端上游的 DNA 序列，长度从 100bp 到 2000bp 不等，其在转录水平上调控基因的起始时间和表达程度。目前，启动子的表达模式及强度可以通过连接报告基因来检测，通常包括 *GUS*、 *GFP*、*LUC* 等。原理图如下：



应用范围：

1、 稳定转化分析启动子在研究植物中的表达位置和表达强度；

2、 瞬时转化分析启动子活性的强弱；

3、 序列突变分析启动子的顺式作用元件。

公司优势：

1、本司有功能齐全的 *GUS*、 *GFP*、*LUC* 报告载体及对应的阴阳性对照载体 ；

2、本司有多种植物稳定转化和瞬时转化技术，并可同时定性和定量检测启动子活性；

服务流程：

咨询下单—确定实验信息—载体构建—植物转化—报告基因活性检测—结果交付。

结果交付：

标准实验报告，包括实验步骤与结果；

GFP 报告基因系统： GFP 荧光图片；

GUS 报告基因系统： GUS 染色图片及定量分析柱状图，瞬时转化附送阴阳性对照组；

LUC 报告基因系统：荧光素酶活性显色图片及定量分析柱状图(附送阴阳性对照组)；

发表级别的组图。

送样要求：

植物组织需要活体寄送；

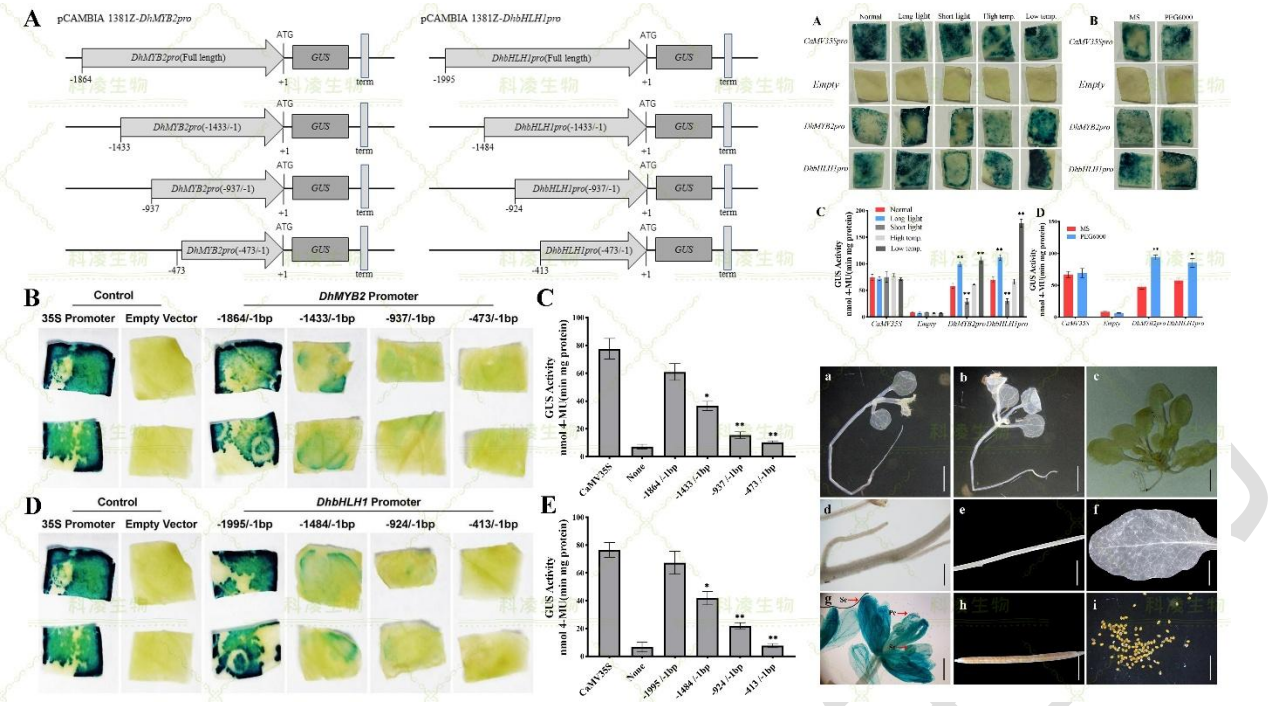
载体需要新鲜或甘油菌液体积大于 0.5 ml，冰袋运输；

质粒 DNA 体积大于 20 μl，浓度不低于 30ng/μl,，且主带明显无降解；

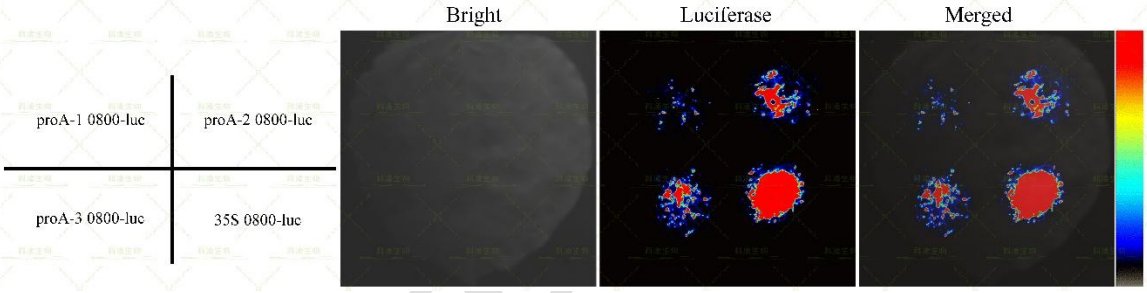
提供测序结果以及抗性；

如需我司构建载体，要求详见载体构建。

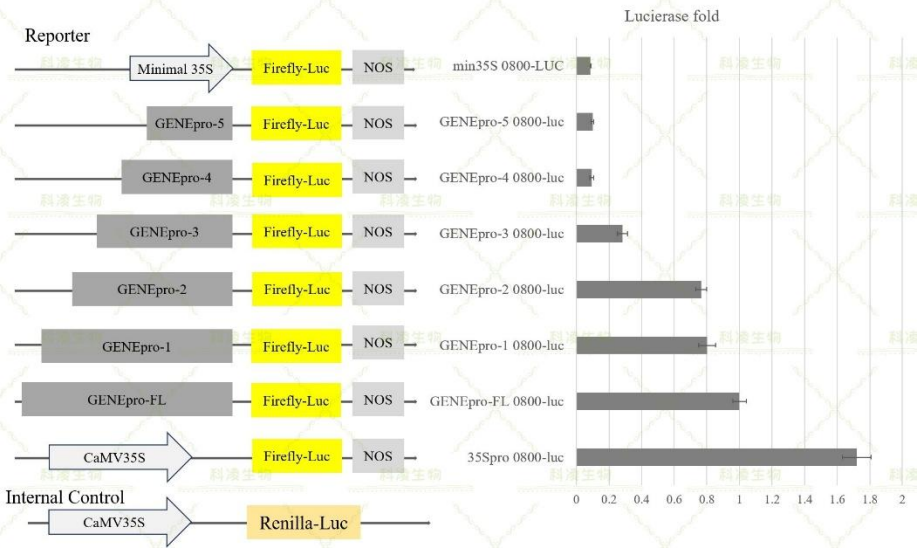
本司服务案例（以 GUS、荧光素酶检测为例）：



结果初析：1、启动子截短后连接 GUS 注射烟草细胞并进行染色及活性检测。2、启动子连接 GUS 报告基因进行胁迫和激素处理。3、拟南芥不同组织器官的 GUS 染色检测。



结果初析：启动子全长及截短后注射烟草叶肉细胞进行荧光素酶检测。启动子全长（3）活性较强，且比 35S 启动子活性弱。截短至 pro-2 时活性基本没变化，截短至 pro-1 时活性明显减弱。

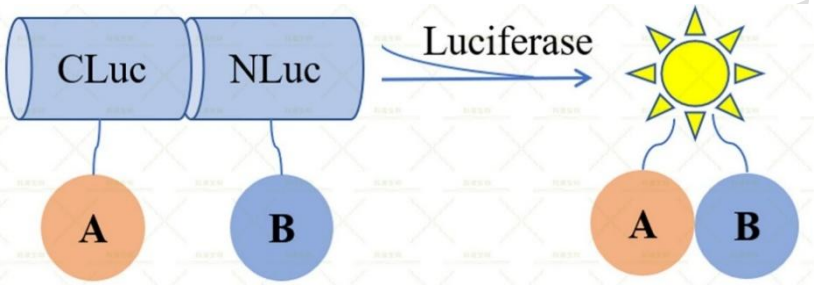


结果初析：启动子全长及截短后注射烟草叶肉细胞进行荧光素酶检测。启动子全长活性较强，且比 35S 启动子活性弱。随着序列截短启动子活性逐步减弱，并在 2-3 时减弱最明显。

9 荧光素酶互补实验（Spilt-luc）

技术简介：

荧光素酶互补实验（Luciferase Complementation Assay，LCI）是近年来形成的基于蛋白质空间互作驱动酶活性恢复的技术。其核心原理是将荧光素酶蛋白被切成 N 端和 C 端 2 个功能片段，即 NLuc (2–416AA)和 CLuc (398–550AA)。两个目的蛋白分别与 NLuc 和 CLuc 融合，如果 2 个目标蛋白发生特异性相互作用时，荧光素酶的 NLuc 和 CLuc 在空间上会足够靠近并正确组装，此时，形成有活性的荧光素酶，荧光素酶分解萤光素底物并产生荧光。原理图如下：



应用范围：

1、可在植物体内检测蛋白之间有无相互作用；

2、可定量检测目的蛋白间的互作强度。

公司优势：

1、本司使用改造后的荧光素酶表达载体，降低假阳性率；

2、实验中增加阴阳性对照组，提高实验准确率。

服务流程：

咨询下单—确定实验信息—载体构建—烟草注射—荧光素酶拍照—结果交付。

结果交付：

标准实验报告，包括实验步骤与结果；

荧光素酶显色拍照图(附送阴阳性对照组)；

发表级别的组图。

送样要求：

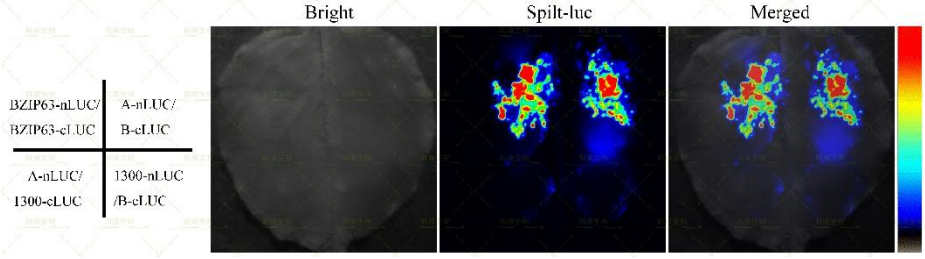
载体需要新鲜或甘油菌液体积大于 0.5 ml，冰袋运输；

质粒 DNA 体积大于 20 μl，浓度不低于 30ng/μl，且主带明显无降解；

提供测序结果以及抗性；

如需我司构建载体，要求详见载体构建。

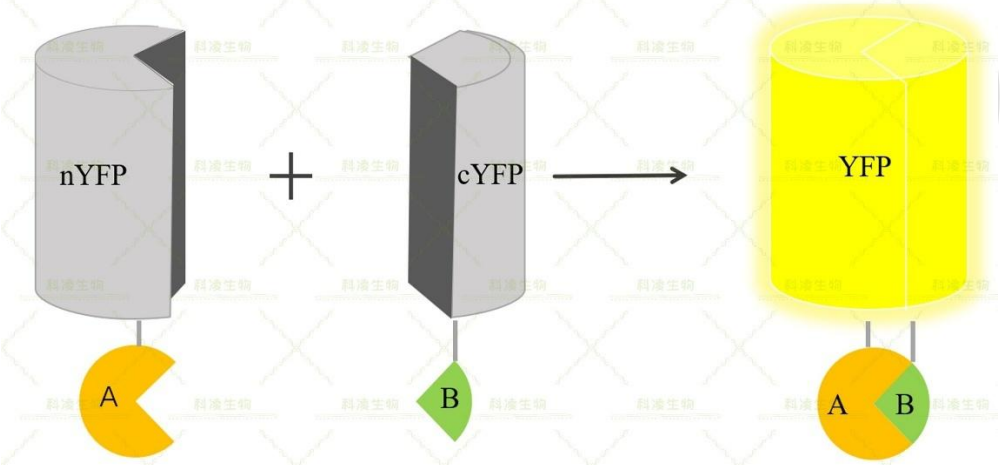
本司服务案例：



10 双分子荧光互补实验（BiFC）

技术简介：

双分子荧光互补（BiFC）是一种直观、快速地判断目的蛋白在细胞中相互作用和定位的技术。GFP 两个 β 片层之间的 loop 结构上有可以插入外源蛋白而不影响 GFP 荧光活性的位点，BiFC 技术利用该特性将荧光蛋白分割成两个不具有荧光活性的分子片段，再分别与目标蛋白连接形成融合蛋白。当两个目的蛋白发生特异性相互作用时，两个荧光蛋白片段在空间上相互靠近并互补，从而重新组装成完整的具有荧光活性的蛋白，该荧光信号可通过荧光显微镜直接观察。若蛋白间无相互作用，则无法产生荧光。原理图如下：



应用范围：

1、可在植物体内检测蛋白之间有无相互作用及定位；

2、可用于研究蛋白之间的弱相互作用；

3、可用于研究蛋白之间瞬间相互作用的强度和位置变化。

公司优势：

1、本司有多种用于 BiFC 的荧光表达载体，可用于植物稳定和原生质体瞬时转化(表 1)；

2、本司有多种定位蛋白 Marker，并已在不同单双子叶植物中验证(表 2)；

3、本司长期种植水稻、烟草、拟南芥等幼苗，实验周期短；

4、不同转化系统阴阳性对照，排除背景干扰、信号微弱等技术问题，确保检测灵敏度与准确性；

5、本司可根据老师要求安排不同植物种植，并进行 BiFC 检测。

服务流程：

咨询下单—确定实验信息—载体构建—植物转化—激光共聚焦显微镜拍照—结果交付。

结果交付：

标准实验报告，包括实验步骤与结果；

互作蛋白检测组与 Marker 共定位显微图片(附送阴阳性对照组)；

发表级别的组图。

送样要求：

植物组织需要活体寄送；

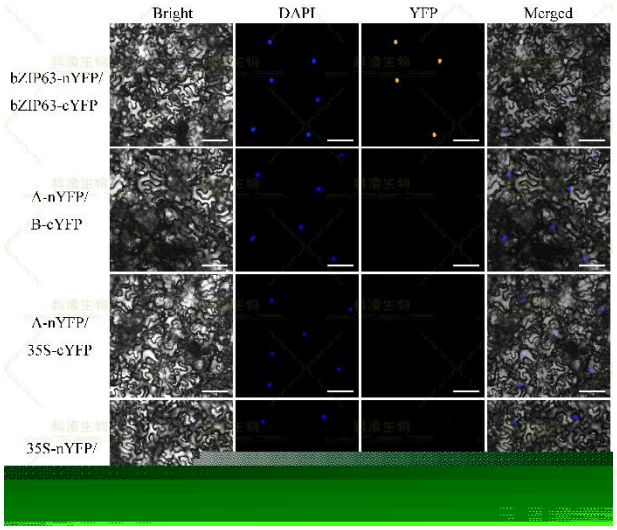
载体需要新鲜或甘油菌液体积大于 0.5 ml，冰袋运输；

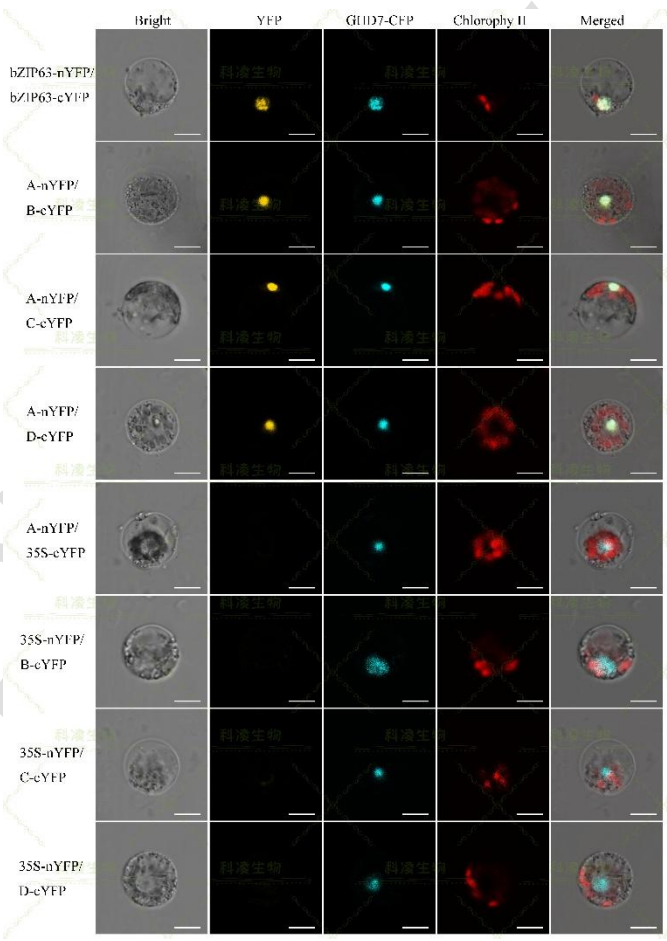
质粒 DNA 体积大于 20 μl，浓度不低于 30ng/μl,，且主带明显无降解；

提供测序结果以及抗性；

如需我司构建载体，要求详见载体构建。

本司服务案例（以烟草叶肉细胞、拟南芥原生质体、水稻原生质体为例）：





结果初析：目的蛋白 A 和 B 分别融合 YFP 荧光标签的 C 端和 N 端序列，并与带 CFP/mCherry 的细胞结构定位 Marker 共转细胞，最终判断目的蛋白之间的互作关系及位置。

送样要求：

建库实验组织样本需要干冰寄送，且质量不少于 10g；

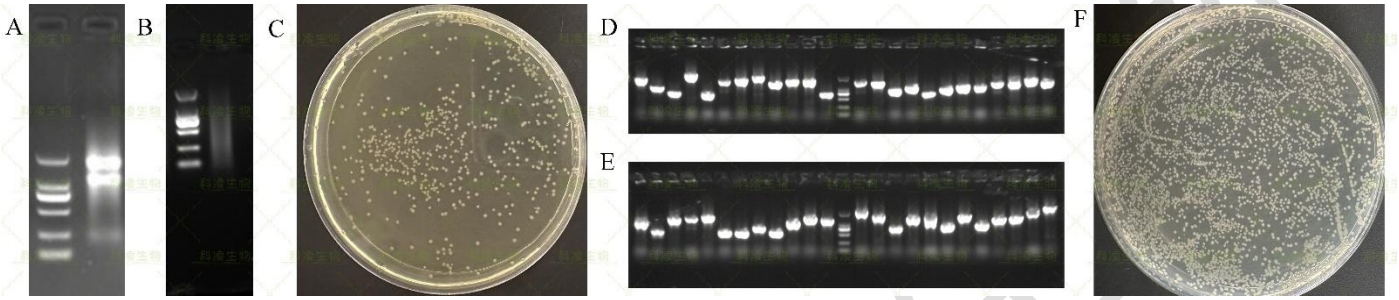
载体需要新鲜或甘油菌液体积大于 0.5 ml，冰袋运输；

质粒 DNA 体积大于 20 μl，浓度不低于 30ng/μl,，且主带明显无降解；

提供测序结果以及抗性；

如需我司构建载体，要求详见载体构建。

本司服务案例（以水稻核文库构建为例）：

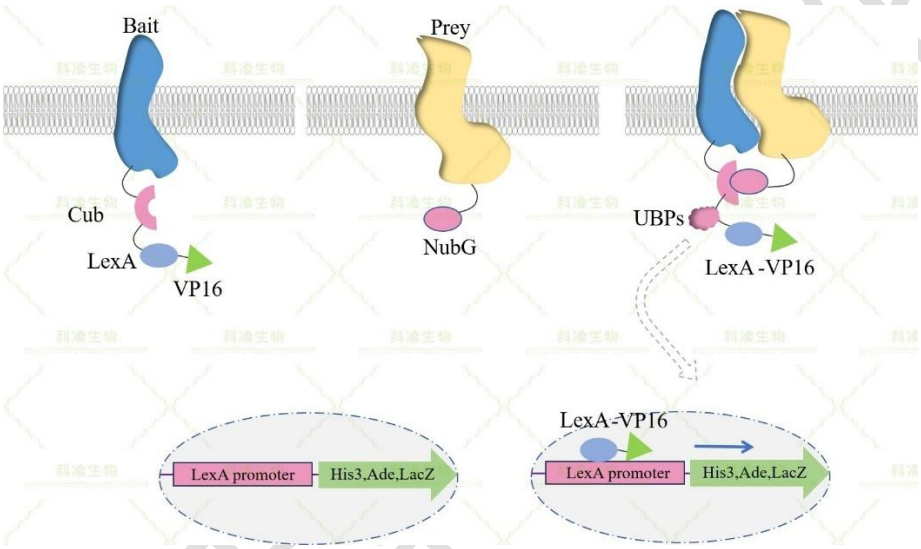


结果初析：水稻叶片 RNA 提取后电泳检测（**A**），显示 RNA 的 28S 和 18S 条带清晰，说明样品总 RNA 的浓度较高且完整性良好，可用于后续 mRNA 纯化。mRNA 提取纯化后电泳检测（**B**），显示 mRNA 呈现弥散的条带并集中在 500-2000bp 处，说明 mRNA 无降解，可用于后续文库片段的制备。初级文库质粒制备后转化大肠杆菌并涂板用于库容计算（**C**），显示库容约 4.5×10^6cfu/mL，说明文库基本确保了样本中表达信息(mRNA)的完整性。初级和次级文库插入片段大小检测（**D**，**E**），显示文库插入片段阳性率超过 95%并且插入片段均超过 750bp。次级文库质粒制备后转化大肠杆菌并涂板用于库容计算（**F**），显示库容约 7.5×10^6cfu/mL。

14 酵母双杂交文库构建及筛选（膜）

技术简介：

膜蛋白酵母双杂交系统是将泛素作为降解信号分子来用于膜蛋白之间的互作检测。在膜双杂交体系中，泛素被分为 Cub 和 NubG 两个结构域，并在互作检测时各自连接一个目的蛋白。Cub 同时连接转录激活因子 LexA-VP16 并形成融合蛋白（LexA-VP16 是由细菌 LexA-DNA 结合域和单纯疱疹病毒 VP16 激活蛋白组成的人工合成转录因子），当两个目的蛋白存在相互作用时，NubG 和 Cub 在空间上相互接近并形成完整的泛素分子，导致转录激活因子 LexA-VP16 被泛素专一性蛋白酶(UBPs)切割，游离的 LexA-VP16 进入细胞核后激活报告基因 His3，Ade 和 LacZ 的转录与表达。因为膜杂交系统的正常运行需要 bait(Cub-LexA-VP16)和 prey(NubG)位于胞浆中，因此不同的蛋白需要选择合适的载体。原理图如下：



应用范围：

筛选与目的蛋白互作的未知蛋白。

公司优势：

1、自研不同植物及多糖多酚 RNA 提取试剂盒，保证 RNA 高提取量及完整性；

2、高质量的 mRNA 纯化技术，保证后续高库容（$1*10^7$ 次方）；

3、Gateway 构建方法，确保文库基因均一化，且无冗余；

4、文库构建过程无 PCR 过程确保平均插入片段超过 1kb。

服务流程：

建库：咨询下单—植物材料寄送—文库构建—质检—结果交付；

筛库：诱饵确认—载体构建—文库筛选—结果交付。

结果交付：

标准实验报告，包括实验步骤与结果；

建库产品：1、初次级文库甘油菌各 4 ml；2、初次级文库质粒各 200 μg；

筛库：50 个阳性克隆的 PCR 测序，超过 50 个克隆部分为 40 元/克隆测序；

建库和筛库过程的图片（单反拍照）。

送样要求：

建库实验组织样本需要干冰寄送，且质量不少于 10g；

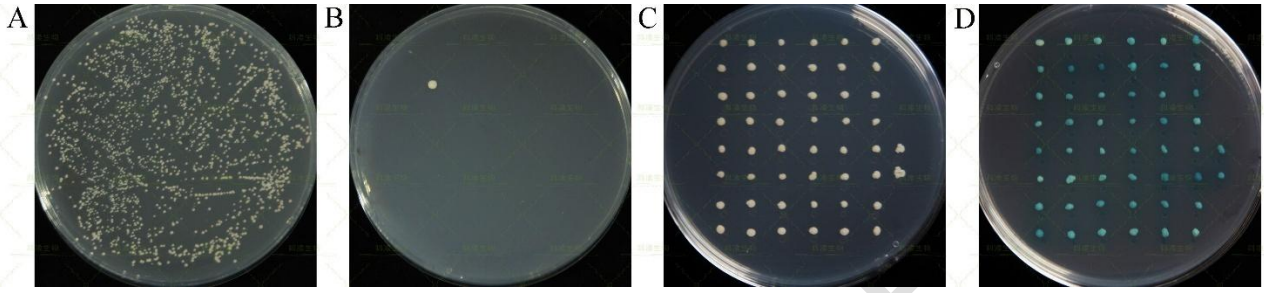
载体需要新鲜或甘油菌液体积大于 0.5 ml，冰袋运输；

质粒 DNA 体积大于 20 μl，浓度不低于 30ng/μl,，且主带明显无降解；

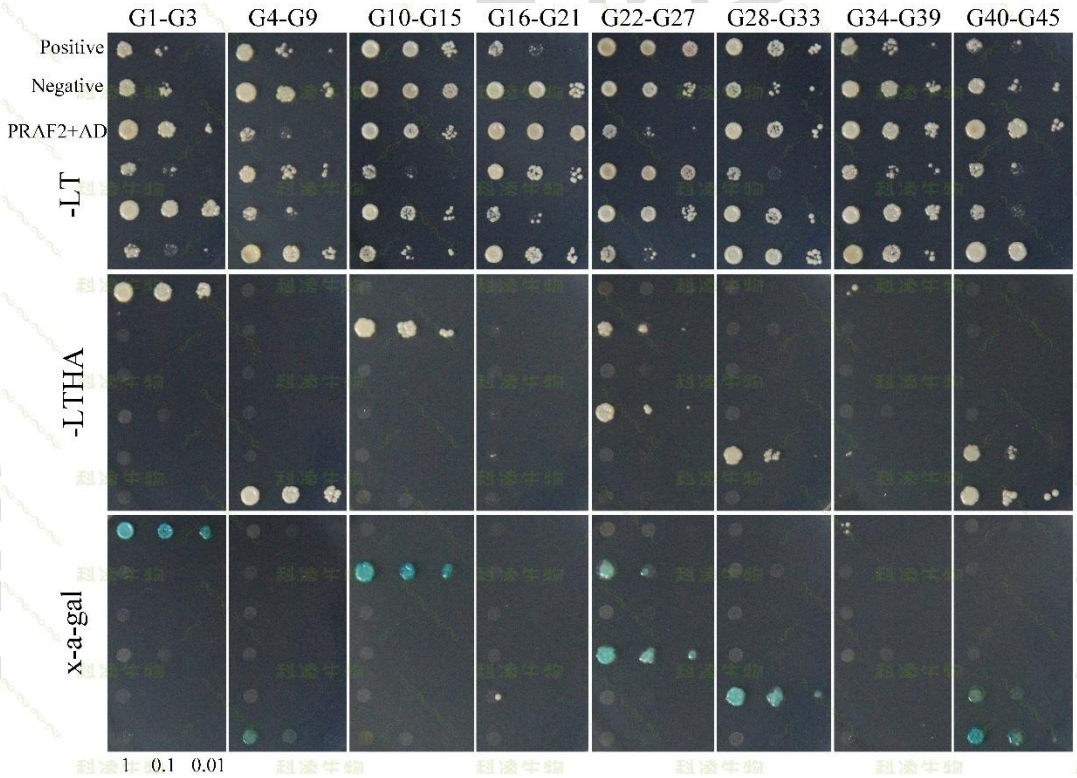
提供测序结果以及抗性；

如需我司构建载体，要求详见载体构建。

本司服务案例（以膜文库筛选为例）：



结果初析：诱饵质粒和文库质粒共转化酵母细胞后二缺（-Leu-Trp）平板上检测转化效率（**A**），高转化效率保障诱饵和文库所有基因表达质粒成功转化进入酵母。转化后酵母细胞涂布 100 个四缺平板（-Leu-Trp-His-Ade）并进行筛选（**B**），此时每个平板上会长出个别阳性克隆。将筛选平板上克隆转移至四缺和含有 x-a-gal 的平板上（**C，D**），正常生长和显色的克隆可以判断为互作情况。最后，PCR 得到文库质粒中的片段并测序，数据库比对得到互作候选基因。

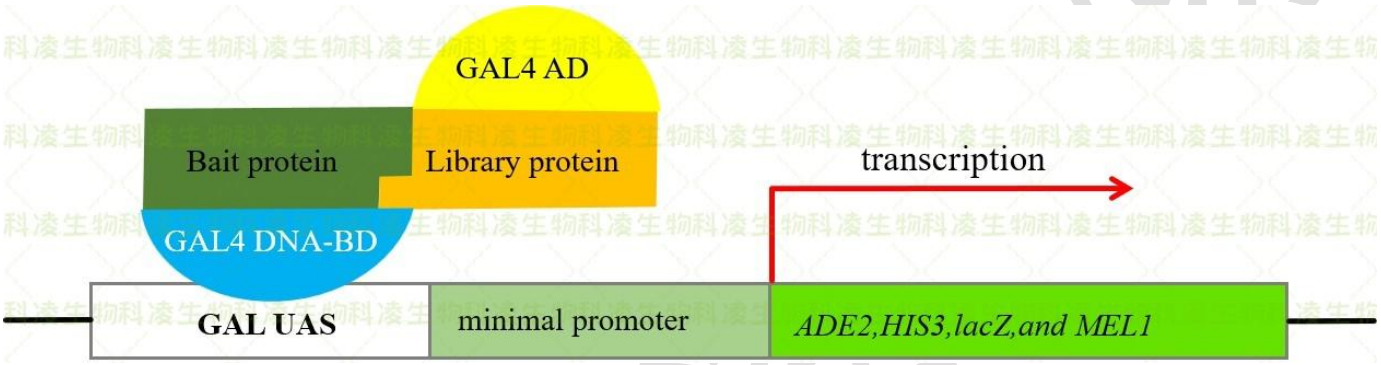


结果初析：互作候选基因扩增全长并重新构建载体，回转验证互作情况。结果显示，仅有部分序列可正常与诱饵互作，其余序列均无法互作。回转点对点验证成功的可用于后续基因功能的研究。

15 酵母双杂交互作验证（核体系）

技术简介：

酵母双杂交系统是在酵母体内通过重建有活性转录因子来鉴定蛋白质之间的相互作用。GAL4 转录因子由 DNA 结合结构域(Binding Domain, BD)和转录激活结构域(Activation Domain, AD)组成，并且这两个结构域对于基因的转录激活都是必须的。在 GAL4 系统中，将两个目的蛋白分别构建至 BD 和 AD 载体中并共转化酵母细胞，以重组 GAL4 转录因子。在酵母内表达的两个蛋白若发生相互作用，系统则表现出完整的 GAL4 转录因子活性并可激活 UAS 下游启动子，激活相应报告基因的表达，此后可在相应的营养缺陷型培养基上筛选阳性。该系统中与 BD 融合的蛋白为诱饵蛋白（Bait），构建在 pGBKT7 表达载体上。与 AD 融合的蛋白为靶蛋白（Prey），构建在 pGADT7 表达载体上。原理图如下：



应用范围：

1、检测蛋白间的相互作用；

2、检测蛋白间互作的位点和结构域。

公司优势：

1、诱饵蛋白自激活检测，消除蛋白自激活影响；

2、互作检测组克隆不同梯度稀释，可直观观察互作强弱；

3、本司具有多种互作检测方法，可验证酵母杂交结果。

服务流程：

咨询下单—实验信息确认—载体构建—自激活和点对点检测—结果交付。

结果交付：

标准实验报告，包括实验步骤与结果；

互作检测酵母梯度稀释点板图（单反拍照）。

送样要求：

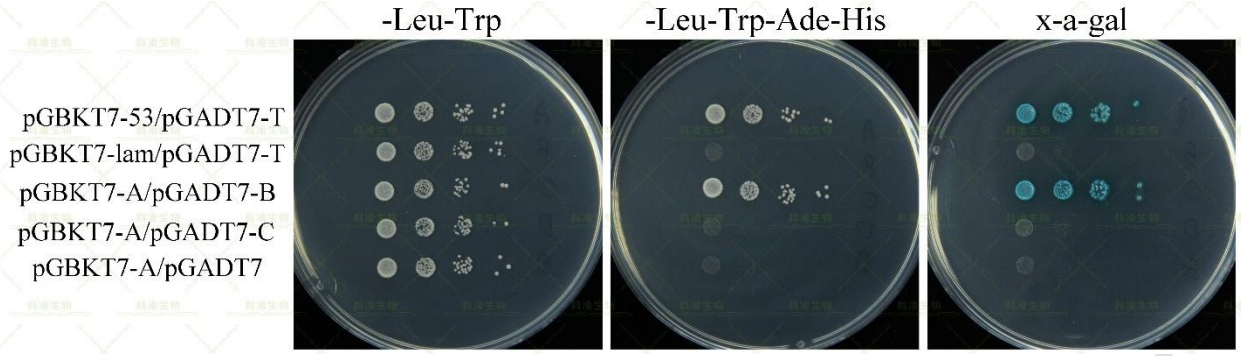
载体需要新鲜或甘油菌液体积大于 0.5 ml，冰袋运输；

质粒 DNA 体积大于 20 μl，浓度不低于 30ng/μl,，且主带明显无降解；

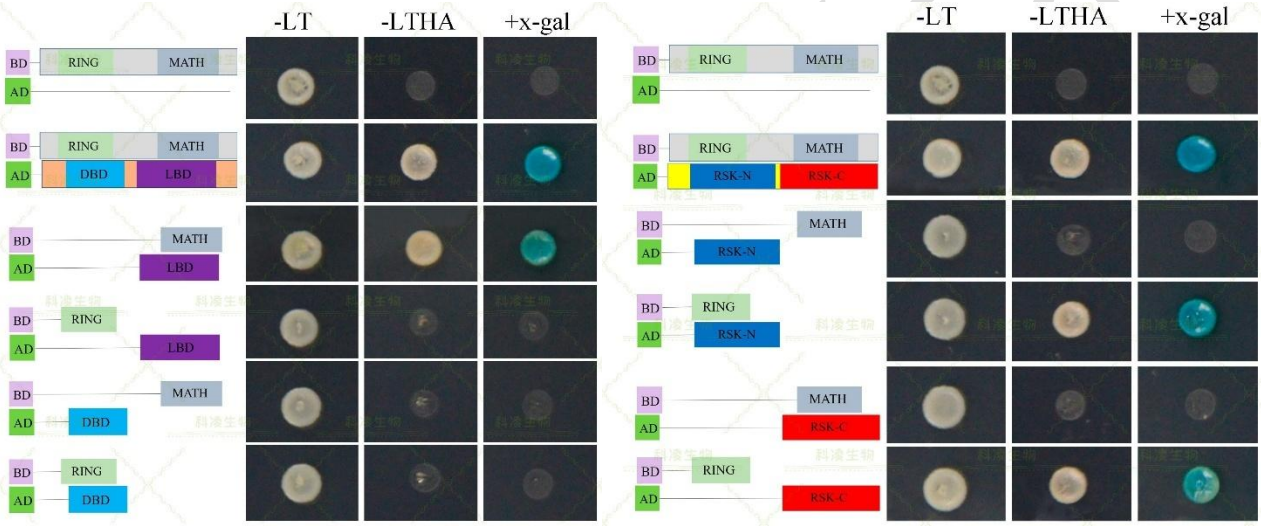
提供测序结果以及抗性；

如需我司构建载体，要求详见载体构建。

本司服务案例：



结果初析：所有共转 pGBKT7 和 pGADT7 质粒的酵母菌在二缺培养基上都长出了克隆，说明共转化成功。将二缺培养基上的克隆挑取至四缺培养基中发现，除了共转化阳性对照质粒菌株正常长出克隆外，A+B 实验组也可以正常长出克隆，而阴性对照、自激活检测组和 A+C 实验组都没有长出克隆，说明蛋白 A 和蛋白 B 之间存在互作的可能性，而蛋白 A 和蛋白 C 不存在互作关系。

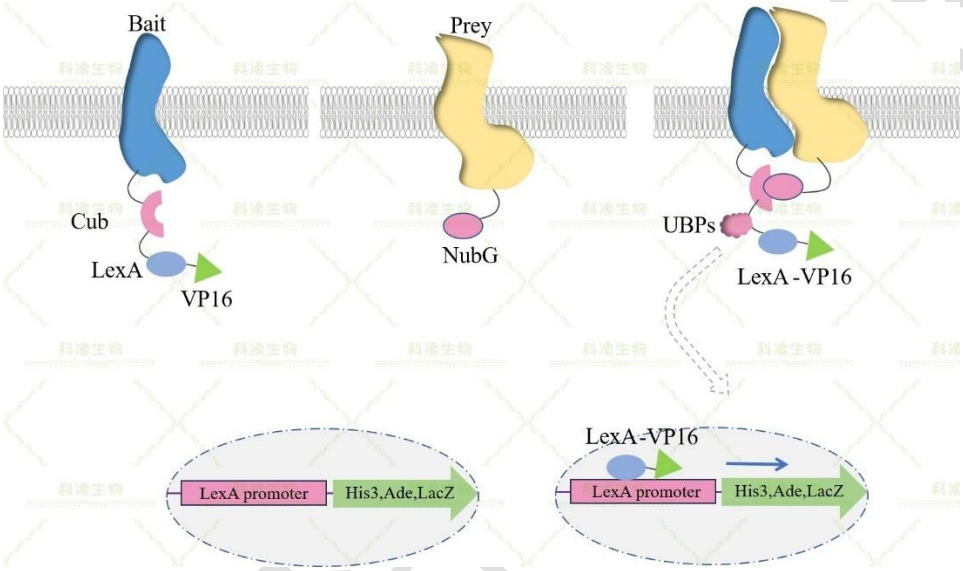


结果初析：蛋白 A 与 B 和 C 之间都有互作关系，为了确认蛋白之间具体互作的序列和结构域，对截短序列进行点对点检测后，显示 A 和 B 的蛋白互作由 MATH 和 LBD 结构域介导，A 和 C 的蛋白互作由 RING 和 RSK-N 结构域介导。

16 酵母双杂交互作验证（膜体系）

技术简介：

膜蛋白酵母双杂交系统是将泛素作为降解信号分子来用于膜蛋白之间的互作检测。在膜双杂交体系中，泛素被分为 Cub 和 NubG 两个结构域，并在互作检测时各自连接一个目的蛋白。Cub 同时连接转录激活因子 LexA-VP16 并形成融合蛋白（LexA-VP16 是由细菌 LexA-DNA 结合域和单纯疱疹病毒 VP16 激活蛋白组成的人工合成转录因子），当两个目的蛋白存在相互作用时，NubG 和 Cub 在空间上相互接近并形成完整的泛素分子，导致转录激活因子 LexA-VP16 被泛素专一性蛋白酶(UBPs)切割，游离的 LexA-VP16 进入细胞核后激活报告基因 His3，Ade 和 LacZ 的转录与表达。因为膜杂交系统的正常运行需要 bait(Cub-LexA-VP16)和 prey(NubG)位于胞浆中，因此不同的蛋白需要选择合适的载体。原理图如下：



应用范围：

1、检测蛋白间的相互作用；

2、检测蛋白间互作的位点和结构域。

公司优势：

1、诱饵蛋白自激活检测，消除蛋白自激活影响；

2、互作检测组克隆不同梯度稀释，可直观观察互作强弱；

3、本司具有多种互作检测方法，可验证酵母杂交结果。

服务流程：

咨询下单—实验信息确认—载体构建—自激活和点对点检测—结果交付。

结果交付：

标准实验报告，包括实验步骤与结果；

互作检测酵母梯度稀释点板图（单反拍照）。

送样要求：

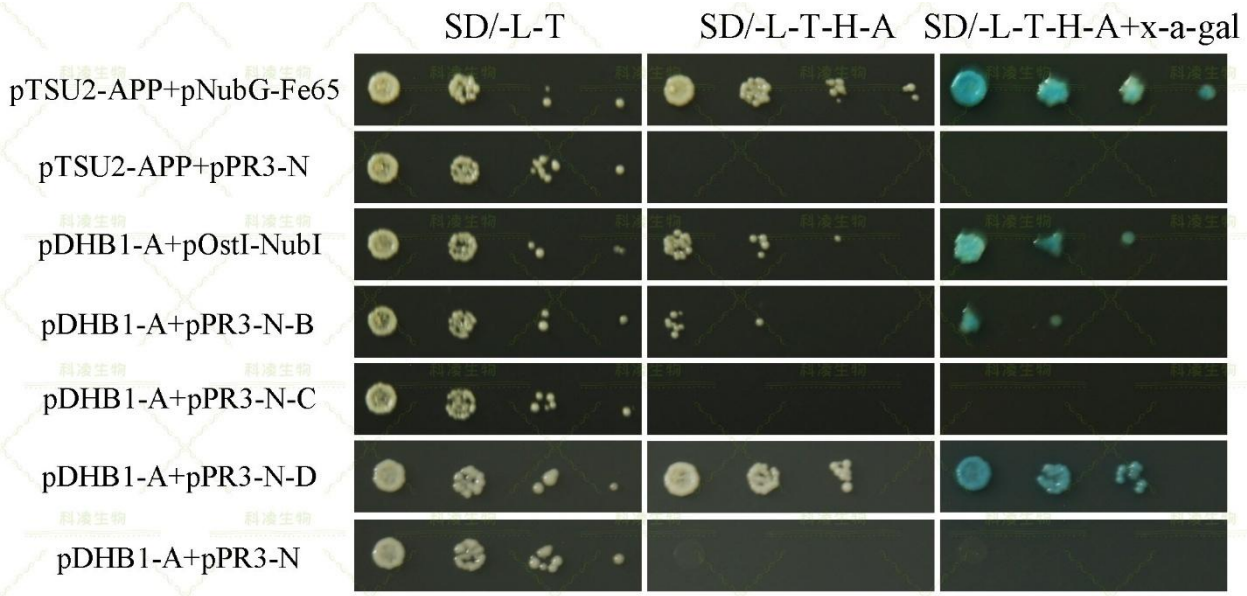
载体需要新鲜或甘油菌液体积大于 0.5 ml，冰袋运输；

质粒 DNA 体积大于 20 μl，浓度不低于 30ng/μl,，且主带明显无降解；

提供测序结果以及抗性；

如需我司构建载体，要求详见载体构建。

本司服务案例：

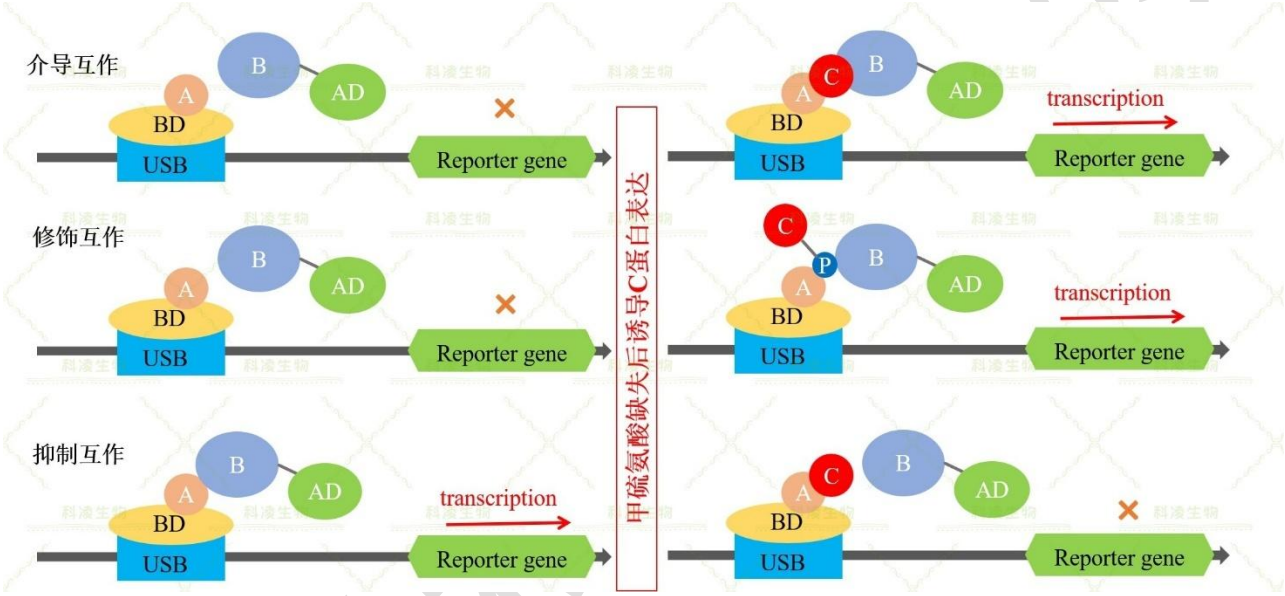


结果初析：所有共转 pDHB1 和 pPR3-N 质粒的 NMY51 酵母菌在二缺培养基上都长出了克隆，说明共转化成功。将二缺培养基上的克隆挑取至四缺培养基中发现，除了共转化阳性对照质粒菌株正常长出克隆外，诱饵质粒 pDHB1-A 与 pOstI-NubI 共转化菌株也可正常长出克隆，说明诱饵质粒顺利融合载体上的标签蛋白并可正常表达，可进行后续实验。同时，A+B、A+D 实验组也正常长出克隆，而阴性对照、自激活检测组和 A+C 实验组都没有长出克隆，说明蛋白 A 与蛋白 B 和 D 之间存在互作的可能性，而蛋白 A 和蛋白 C 不存在互作关系。

17 酵母三杂交互作验证

技术简介：

酵母三杂交系统是由酵母双杂交技术改进而来，该系统引进了 pBridge 质粒，其主要特点是能够同时插入两个外源蛋白。其中，MCS1 插入蛋白的 N 端融合了 Gal4 系统中的 BD 结合结构域，MCS2 中插入的蛋白不融合任何标签且上游为 Pmet25 启动子，在甲硫氨酸 (Met) 缺乏的时候该启动子才能工作，促使下游蛋白基因表达。基于此，酵母三杂交验证时将诱饵蛋白插入至 MCS1 中，第三蛋白插入至 MCS2 中，猎物蛋白构建至 pGADT7 载体上。转化酵母菌株后，可以在缺陷型培养基上进行筛选，相较于双杂交的区别是筛选的缺陷型培养基必须是在甲硫氨酸缺陷型的基础上配置。三杂交主要研究第三个成分对两个蛋白互作关系的影响，包括促进、抑制或无影响，其中第三个成分可以是蛋白、RNA 或小分子，用于研究蛋白-蛋白、RNA-蛋白和小分子-蛋白相互作用。原理图如下：



应用范围：

1、检测三个蛋白间的相互作用模式；

2、检测蛋白复合物的作用机制和功能。

公司优势：

1、诱饵蛋白自激活检测，消除蛋白自激活影响；

2、互作检测组克隆不同梯度稀释，可直观观察互作强弱；

3、本司具有多种互作检测方法，可验证酵母杂交结果。

服务流程：

咨询下单—实验信息确认—载体构建—自激活和点对点检测—结果交付。

结果交付：

标准实验报告，包括实验步骤与结果；

互作检测酵母梯度稀释点板图（单反拍照）。

送样要求：

载体需要新鲜或甘油菌液体积大于 0.5 ml，冰袋运输；

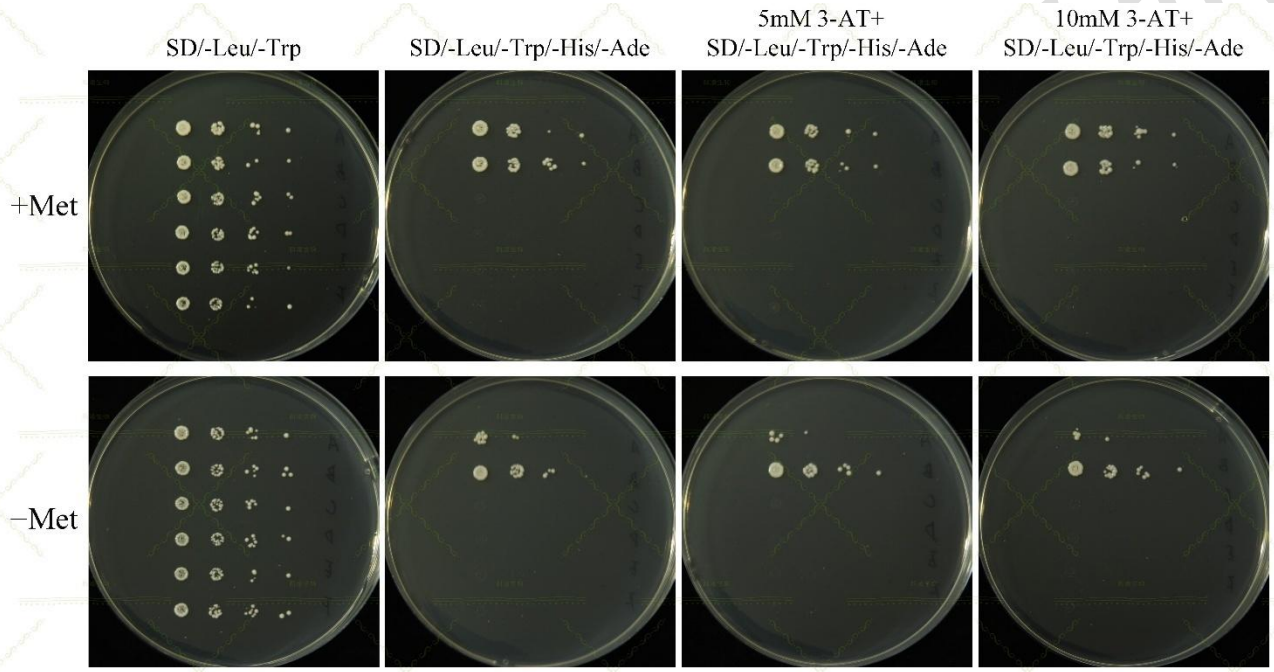
质粒 DNA 体积大于 20 μl，浓度不低于 30ng/μl,，且主带明显无降解；

提供测序结果以及抗性；

如需我司构建载体，要求详见载体构建。

本司服务案例：

A	B	C	D	E	F
实验组1	**实验组2**	**实验组3**	**实验组4**	**实验组5**	**实验组6**
pBridge-A-C	pBridge-A	pBridge	pBridge-A-C	pBridge-A	pBridge
pGADT7-B	pGADT7-B	pGADT7-B	pGADT7	pGADT7	pGADT7

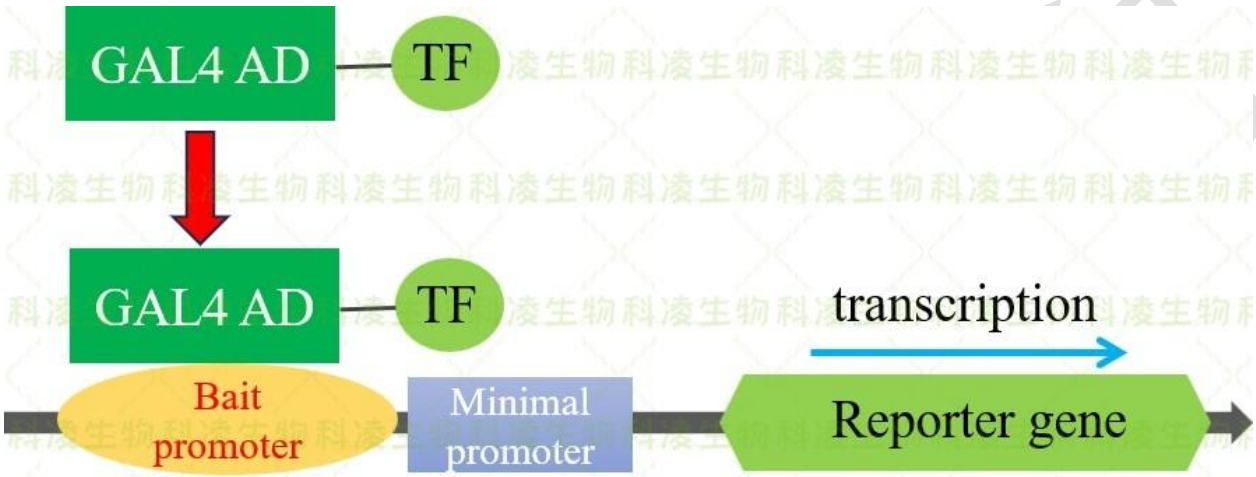


结果初析：所有共转 pBridge 和 pGADT7 质粒的 AH109 酵母菌在二缺培养基上都长出了克隆，说明共转化成功。将二缺培养基上的克隆挑取至四缺培养基中显示，A+ B 和 A-C+ B 共转化酵母菌可以在四缺中生长，说明 A 蛋白和 B 蛋白存在互作，当加入 3-AT 时克隆仍正常生长，说明 A 蛋白和 B 蛋白互作强度较高。在将酵母克隆转移至甲硫氨酸缺陷培养基（Met）后，C 蛋白被诱导表达。此时，A-C+B 共转化实验组克隆生长速度明显减缓，而 A+B 实验组仍正常长出克隆，实验结果说明诱导出来的 C 蛋白抑制了 A 蛋白和 B 蛋白之间的互作。

18 酵母单杂交互作验证

技术简介：

酵母单杂交技术是由酵母双杂交 GAL4 系统改进而来，用于研究核酸-蛋白相互作用的互作检测系统。原理是将启动子序列或者顺式作用元件构建至报告基因的上游，并形成诱饵载体，相应的转录因子构建到 pGADT7 载体上形成猎物蛋白。当转录因子结合到顺式作用元件时会激活 Pmin 启动子，从而促进下游报告基因的表达，随后通过缺陷型培养基和筛选标记确认互作与否。目前，该技术主要用于研究真核细胞内顺式作用元件与转录因子或结构域的互作检测等。原理图如下：



应用范围：

1、检测蛋白与启动子间是否存在相互作用；

2、检测启动子中与蛋白互作的顺式作用元件；

3、检测转录因子中与启动子结合的结构域。

公司优势：

1、诱饵蛋白抑制剂背景严格筛选检测，消除酵母本底转录因子激活影响；

2、互作检测组克隆不同梯度稀释，同时设置对照组，确保结果真实有效；

3、本司具有两种单杂交互作检测方法，可验证酵母杂交结果。

服务流程：

咨询下单—实验信息确认—载体构建—背景筛选和点对点检测—结果交付。

结果交付：

标准实验报告，包括实验步骤与结果；

互作检测酵母梯度稀释点板图（单反拍照）。

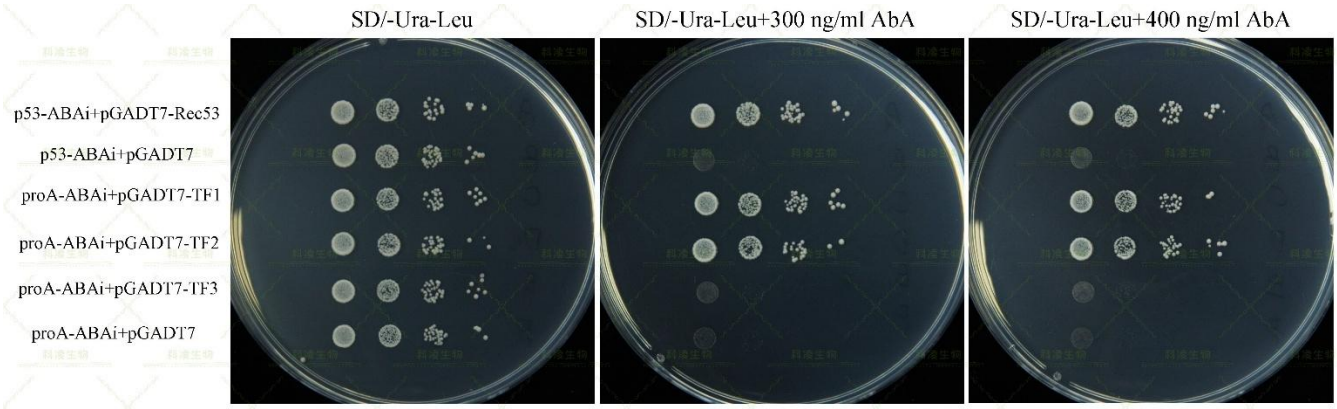
送样要求：

载体需要新鲜或甘油菌液体积大于 0.5 ml，冰袋运输；

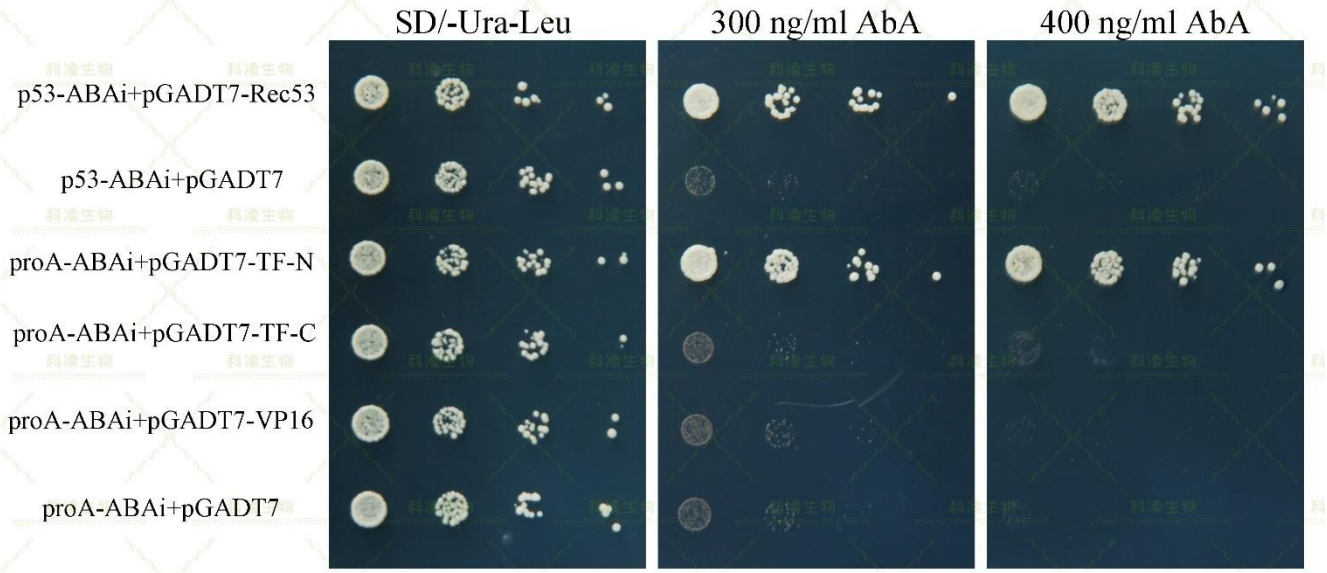
质粒 DNA 体积大于 20 μl，浓度不低于 30ng/μl,，且主带明显无降解；

提供测序结果以及抗性；如需我司构建载体，要求详见载体构建。

本司服务案例：



结果初析：所有共转 pABAi 和 pGADT7 质粒的 YIHgold 酵母菌在二缺培养基上都长出了克隆，说明共转化成功。将 SD/–Leu/–Ura 培养基上的克隆挑取至含有不同浓度 AbA 的 SD/–Leu/–Ura 培养基中生长，具体结果为： 除了阳性对照转化酵母克隆可以在不同浓度的 AbA 中正常生长外，TF1+proA 和 TF2+proA 共转化检测组也可以长出克隆，而 TF3+proA 检测组酵母克隆不能生长，说明 TF1 和 TF2 与 proA 序列结合的可能性较大，而 TF3 与 proA 序列无结合。

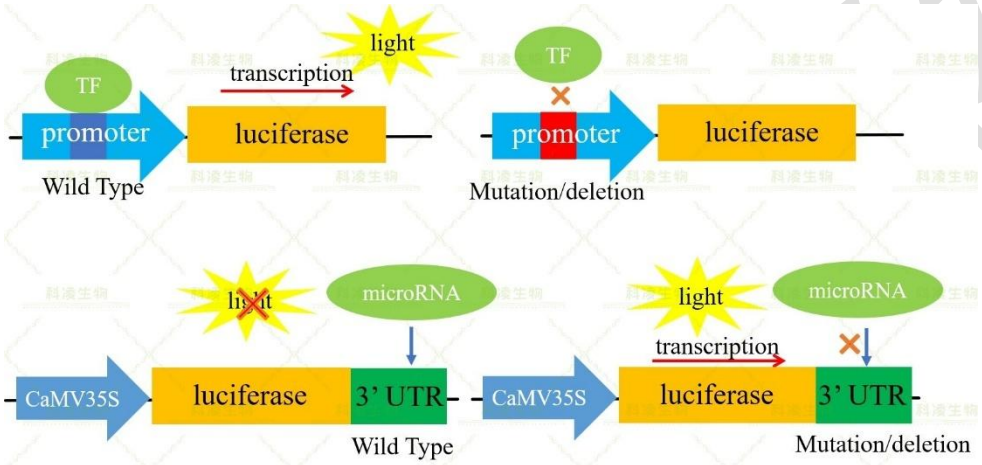


结果初析：转录因子 TF 与 proA 序列存在结合作用，为了确认转录因子与启动子结合的序列和结构域，对 TF 进行序列截短并与 VP16 形成融合蛋白，随后进行点对点检测。结果显示 TF 的 N 端序列可以结合 proA 序列，而 C 端序列无法结合启动子序列。

19 双荧光素酶报告检测实验（Dual-luc）

技术简介：

双荧光素酶报告基因检测系统（Dual-Luciferase Reporter Assay）由萤火虫荧光素酶(Firefly Luciferase)和海肾荧光素酶(Rellina Luciferase)组成，该双报告基因系统相对于单报告基因系统可以提高实验准确性，增加实验数据可信度。在具体实验操作中，海肾荧光素酶基因作为内参使用，萤火虫荧光素酶在特定实验条件下可以表达，两种荧光素酶可以催化各自的底物而显现出生物荧光，随后通过荧光测定仪测定反应过程中释放的两种生物荧光，最后通过分析萤火虫荧光素酶活性的变化判断相应调控元件的活性。原理图如下：



应用范围：

1、检测启动子活性和相应顺式元件对启动子活性的影响；

2、检测转录因子对下游启动子的转录调控；

3、检测 microRNA 对相关基因的靶向和调控作用

4、检测 microRNA 和 lncRNA 的调控研究

5、检测转录因子广义上的调控活性。

公司优势：

1、本司长期种植水稻、烟草、拟南芥等幼苗，实验周期短；

2、不同转化系统阴阳性对照，排除背景干扰、信号微弱等技术问题，确保检测灵敏度与准确性；

3、本司可根据老师要求安排不同植物种植，并进行双荧光素酶检测；

4、启动子表达载体插入位置插入 Pmin35S 序列基本元件，可检测顺式元件的表达；

5、可结合荧光素酶成像实验，保证实验准确性。

服务流程：

咨询下单—实验信息确认—载体构建—植物转化和荧光素酶检测—结果交付。

结果交付：

标准实验报告，包括实验步骤与结果；

荧光素酶检测原始数据，处理数据和柱状图；

可选：荧光素酶成像图片。

送样要求：

植物组织需要活体寄送；

载体需要新鲜或甘油菌液体积大于 0.5 ml，冰袋运输；

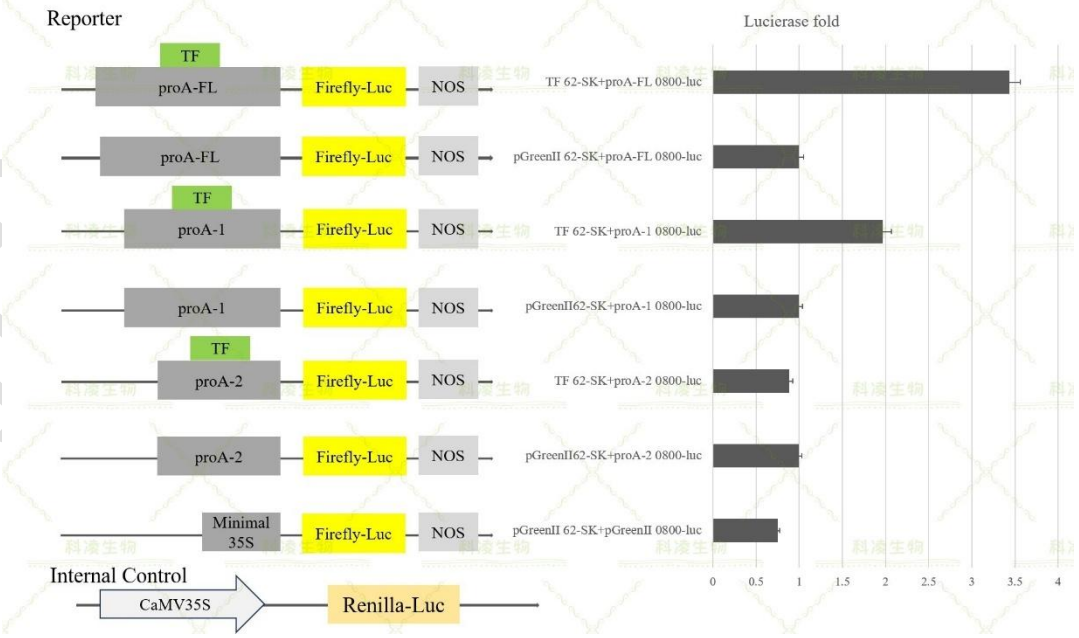
质粒 DNA 体积大于 20 μl，浓度不低于 30ng/μl,，且主带明显无降解；

提供测序结果以及抗性；

如需我司构建载体，要求详见载体构建。

本司服务案例（以烟草叶肉细胞为例）：

结果初析：miRNA 与靶序列及突变序列注射烟草叶肉细胞进行荧光素酶检测。miRNA 可结合野生型序列并降解荧光素酶的表达，而在目的序列发生突变后，miRNA 丧失结合序列的能力。



结果初析：转录因子与启动子全长及截短后序列注射烟草叶肉细胞进行荧光素酶检测。TF 激活启动子全长表达，截短至 pro-1 时仍存在激活作用，截短至 pro-2 时激活作用消失。

20 染色质免疫共沉淀（ChIP-seq/ChIP-PCR）

技术简介：

染色质免疫共沉淀技术（Chromatin Immunoprecipitation，ChIP）也称结合位点分析法，是研究体内蛋白质与 DNA 相互作用的有力工具，通常用于转录因子结合位点或组蛋白特异性修饰位点的研究。本实验的原理是在活细胞状态下通过化学交联剂将蛋白质—DNA 复合物固定，并将其随机打断成一定长度范围内的染色质小片段，然后通过免疫学的方法沉淀出目的蛋白质—DNA 复合体，从而特异性地富集与目的蛋白相结合的 DNA 片段，通过 PCR 扩增的方式检测与蛋白质结合的 DNA 序列。随着第二代测序技术的逐步完善和成熟，将 ChIP 与第二代测序技术相结合的 ChIP-Seq 技术，能够高效地在全基因组范围内检测与组蛋白、转录因子等互作的 DNA 区段，从而完善基因调控网络研究。

应用范围：

1、检测和转录因子结合的顺式作用元件或结合区域；

2、基因组水平上检测转录因子可能结合的顺式作用元件。

公司优势：

1、自研染色质提取裂解液，提高染色质提取效率和杂质去除；

2、针对不同物种进行超声预实验，保证得到合适的 DNA 片段；

3、可测试不同种类的商业化和自制 IP 抗体。

服务流程：

咨询下单—实验信息确认—样本交联和染色质抽提—ChIP 和检测—结果交付。

结果交付：

标准实验报告，包括实验步骤与结果；

染色质超声电泳图、IP 后 PCR 检测和定量 PCR。

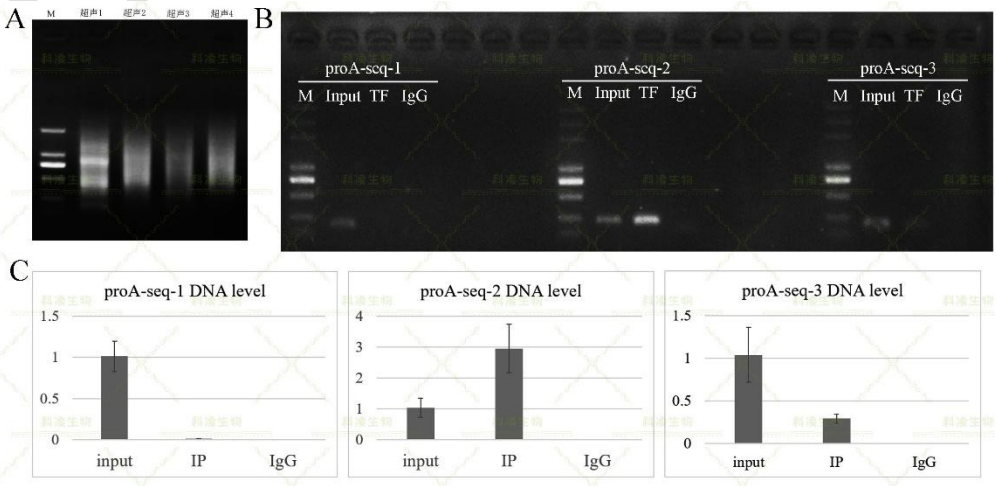
送样要求：

ChIP 实验组织样本需要干冰寄送，且质量不少于 10g；

告知蛋白标签/特异性抗体信息，特异抗体提供 10ul 以上，浓度大于 0.5mg/ml；

特异性抗体需要干冰寄送。

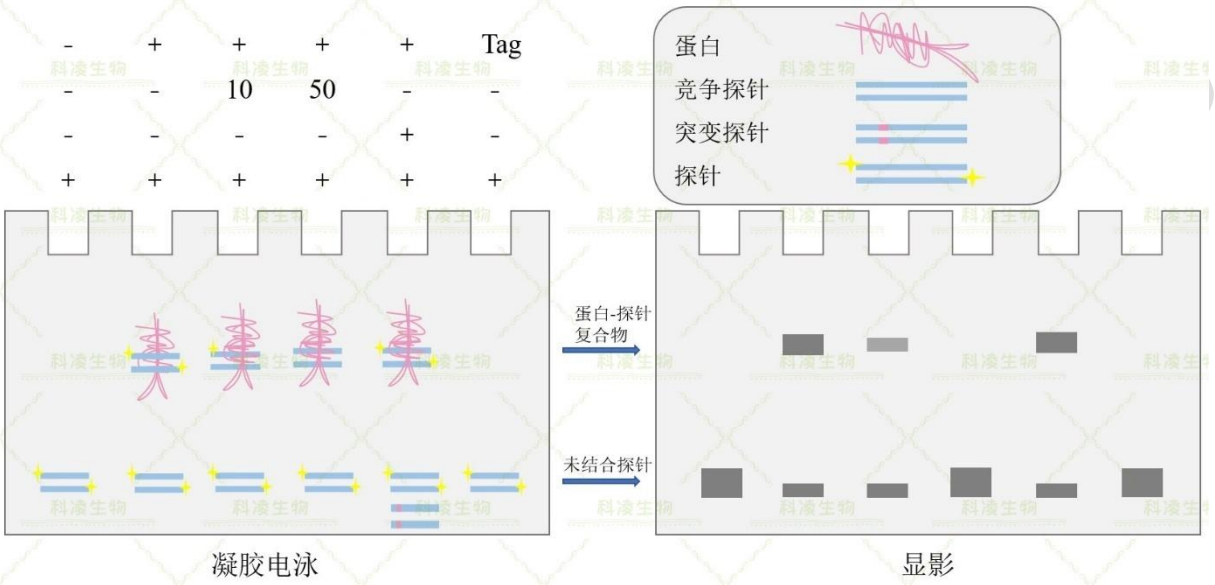
本司服务案例：



21 凝胶电泳迁移实验（EMSA）

技术简介：

凝胶电泳迁移实验(Electrophoretic mobility shift assay，EMSA)又叫凝胶阻滞实验，是一种研究蛋白质与核酸序列相互作用的技术，可用于定性和定量分析。在竞争实验中，合成含有标记物的 DNA 或 RNA 探针，当核酸探针与蛋白样本混合孵育时，样本中的蛋白质与探针会形成蛋白-核酸复合物，这种复合物由于分子量大，在进行 PAGE 电泳时迁移较慢，而没有结合蛋白的探针则迁移较快，从而可以通过观察条带的大小来判断蛋白与核酸的结合情况。原理图如下：



应用范围：

1、检测启动子中与目的蛋白结合的顺式作用元件；

2、检测与蛋白结合的 RNA 序列。

公司优势：

1、使用含促融标签的蛋白表达载体，确保表达出可溶性蛋白；

2、使用荧光标记探针，增加检测灵敏度；

3、增加阴阳性对照组，保证实验结果可靠性。

服务流程：

咨询下单—实验信息确认—探针标记和蛋白表达—EMSA 检测—结果交付。

结果交付：

标准实验报告，包括实验步骤与结果；

蛋白表达考染图、WB 检测图、EMSA 检测图。

送样要求：

如提供蛋白：纯化蛋白 100ul，浓度大于 0.5mg/ml，WB 检测图；

探针序列，如无探针序列，请提供相关文献；

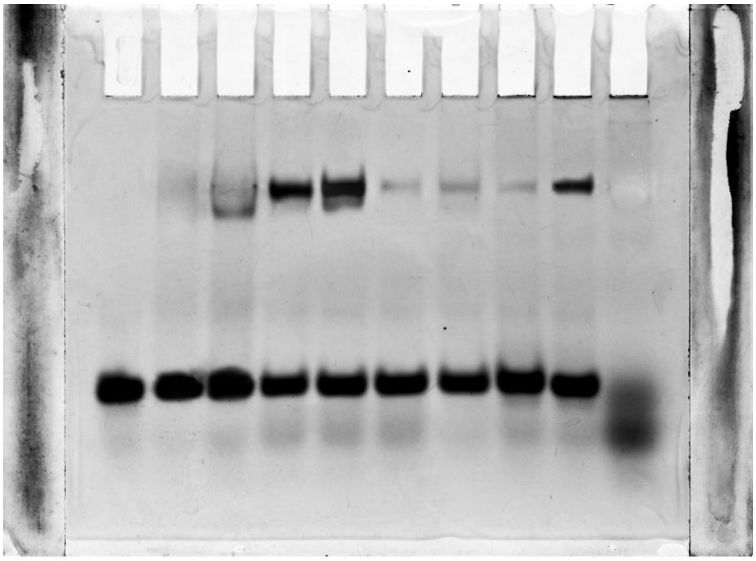
载体需要新鲜或甘油菌液体积大于 0.5 ml，冰袋运输；

质粒 DNA 体积大于 20 μl，浓度不低于 30ng/μl,，且主带明显无降解；

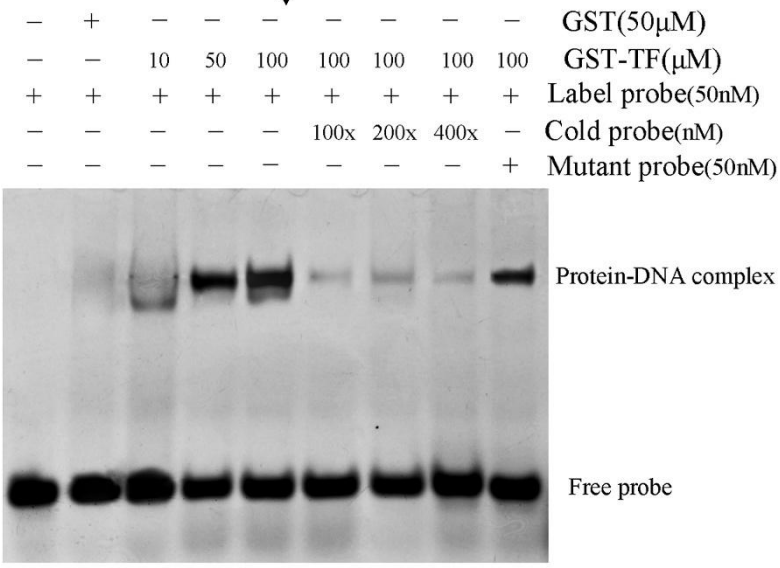
提供测序结果以及抗性；

如需我司构建载体，要求详见载体构建。

本司服务案例（以 GST 标签蛋白为例）：



原图剪切 ↓ 排版作图

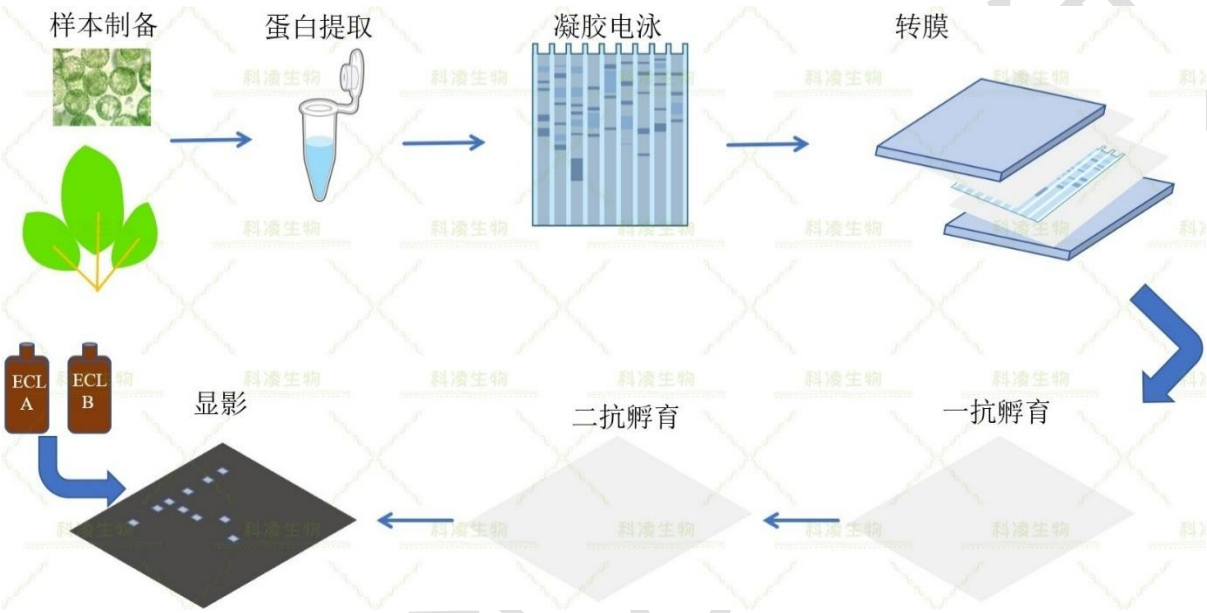


结果初析：目的转录因子与荧光探针结合作用 EMSA 检测。结果显示，仅加入探针而没有加入蛋白的 1 号孔和加了 GST 标签蛋白的 2 号孔没有出现滞留的结合条带，这两组为阴性对照。在加入目的蛋白 TF 时，随着探针浓度的增加结合条带逐渐增强(3-5 号孔)，而在加入竞争性探针后，随着竞争性探针浓度增高，结合条带逐渐减弱(6-8 号孔)，说明目的蛋白和探针结合是特异性的。将竞争性探针换成突变探针后，结合条带又增强了（9 号孔），说明突变后的竞争性探针失去了蛋白结合活性，进一步说明 TF 蛋白与探针结合是特异性的。

22 蛋白 WB 检测

技术简介：

蛋白免疫印迹（ Western Blot，WB）是进行蛋白质分析最流行和成熟的技术之一。其具体操作步骤是将蛋白样本按分子量大小通过 SDS-PAGE 电泳（聚丙烯酰胺凝胶）分离，再转移到固相载体（如 PVDF 膜）上并以非共价键形式吸附，随后通过对应的特异性抗体与靶蛋白起免疫反应（一抗），使用酶或同位素标记的第二抗体与一抗发生反应，最后对底物进行显色或放射自显影以检测特异性靶蛋白的成分和含量。WB 原理图如下：



应用范围：

1、检测不同组织中蛋白的表达水平；

2、检测原核表达蛋白表达情况；

3、体内/体外检测蛋白互作情况。

公司优势：

1、多种植物提取试剂盒，可以提取不同细胞组分蛋白；

2、含有多种植物标签抗体，高效检测转基因植物蛋白表达；

3、可配合互作检测和蛋白修饰检测服务。

服务流程：

咨询下单—实验信息确认—样本寄送—WB 检测—结果交付。

结果交付：

标准实验报告，包括实验步骤与结果；

蛋白 WB 检测图。

送样要求：

WB 检测组织样本和抗体需要干冰寄送，且样本质量不少于 2g；

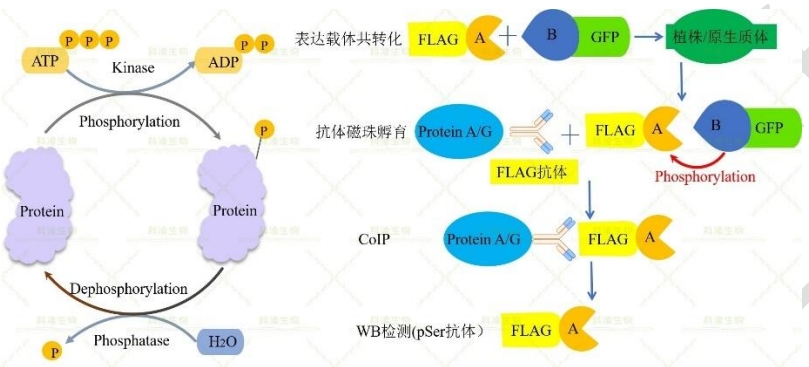
告知蛋白标签/特异性抗体信息，特异抗体提供 10ul 以上，浓度大于 0.5mg/ml；

本司服务案例：

23 蛋白磷酸化检测

技术简介：

蛋白质翻译后修饰（PTMs）在生命活动中具有至关重要的作用，而蛋白质磷酸化是生物体内最重要的翻译后修饰之一，其主要过程是蛋白质上的特定氨基酸残基（通常是丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸）与磷酸基团结合的过程，这一过程由蛋白激酶促进，并可以通过蛋白磷酸酶进行逆转。蛋白免疫印迹(Western Blot，WB)作为一种实验技术可进行体外磷酸化检测，具体流程包括 SDS-PAGE 分离蛋白样本并转至 PVDF 膜上，随后使用磷酸化抗体检测磷酸化蛋白质，而对于丰度低的蛋白，可先用目的蛋白抗体 IP 对蛋白进行富集，再进行 WB 检测被磷酸化的蛋白，检测效率可以大大。原理图如下：



应用范围：

1、检测蛋白磷酸化水平；

公司优势：

1、含有多种植物标签抗体，高效检测转基因植物蛋白表达；

2、可配合互作检测和蛋白修饰检测服务。

服务流程：

咨询下单—实验信息确认—样本寄送—CoIP/WB 检测—结果交付。

结果交付：

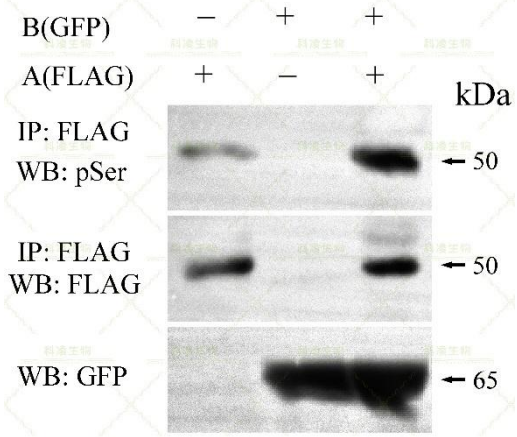
标准实验报告，包括实验步骤与结果；

蛋白 WB 检测图。

送样要求：

WB 检测组织样本需要干冰寄送，且质量不少于 2g。

本司服务案例（以 FLAG 标签蛋白为例）：

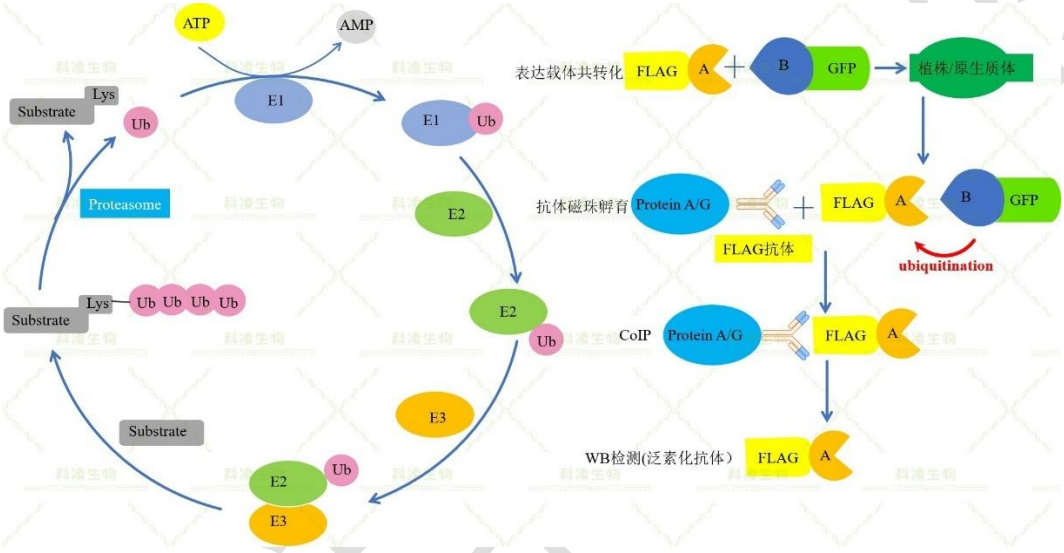


结果初析：使用 FLAG 抗体对注射 A-FLAG 烟草样本进行 IP，WB 检测显示有明显的条带，说明目的蛋白 A 顺利表达并 IP 成功。使用 GFP 抗体对注射 B-GFP 烟草样本进行 WB 检测，显示有明显的条带，说明目的蛋白 B 成功表达。使用磷酸化抗体(pSer)对不同组别样本进行 WB 检测，显示单独表达 A 蛋白时，目的蛋白有微弱的磷酸化条带。而同时表达 A 和 B 蛋白时，目的蛋白 A 磷酸化条带明显增强，说明 B 蛋白可以促进目的蛋白 A 的磷酸化程度。

24 蛋白泛素化检测

技术简介：

泛素为包含 76 个氨基酸，大小约为 8.6 kDa 的蛋白质，将泛素添加到底物蛋白质的过程称为蛋白质泛素化。泛素化是一种动态的翻译后修饰，涉及活化，结合和连接三个步骤，分别由泛素激活酶（E1），泛素偶联酶酶（E2s）和泛素连接酶（E3s）催化。大致流程为：泛素被泛素激活酶(E1)结合并与 ATP 反应，形成泛素-AMP 复合物。然后，泛素会从泛素-AMP 复合物中转移至泛素结合酶(E2)上。泛素结合酶(E2)将泛素从自身转移到特定的底物泛素连接酶(E3)上。每种底物蛋白质都有对应的泛素连接酶，它们能够与特定的底物相互作用。泛素连接酶(E3)将泛素与底物蛋白质结合，形成泛素化的底物蛋白质。泛素连接可以发生在底物蛋白质的特定氨基酸残基上，最常见的是在底物蛋白质的赖氨酸残基上形成泛素链。



应用范围：

1、体内检测蛋白泛素化；

2、体外检测蛋白泛素化。

公司优势：

1、使用含促融标签的蛋白表达载体，确保表达出可溶性蛋白；

2、多种提取方案保证顺利提取植物活性蛋白；

服务流程：

咨询下单—实验信息确认—蛋白表达—泛素化检测—结果交付。

结果交付：

标准实验报告，包括实验步骤与结果；

蛋白表达考染图和 WB 检测图、泛素化检测图。

送样要求：

如提供蛋白：纯化蛋白各 100ul，浓度大于 0.5mg/ml，WB 检测图；

体内实验组织样本需要干冰寄送，且质量不少于 10g；

告知蛋白标签/特异性抗体信息，特异抗体提供 10ul 以上，浓度大于 0.5mg/ml；

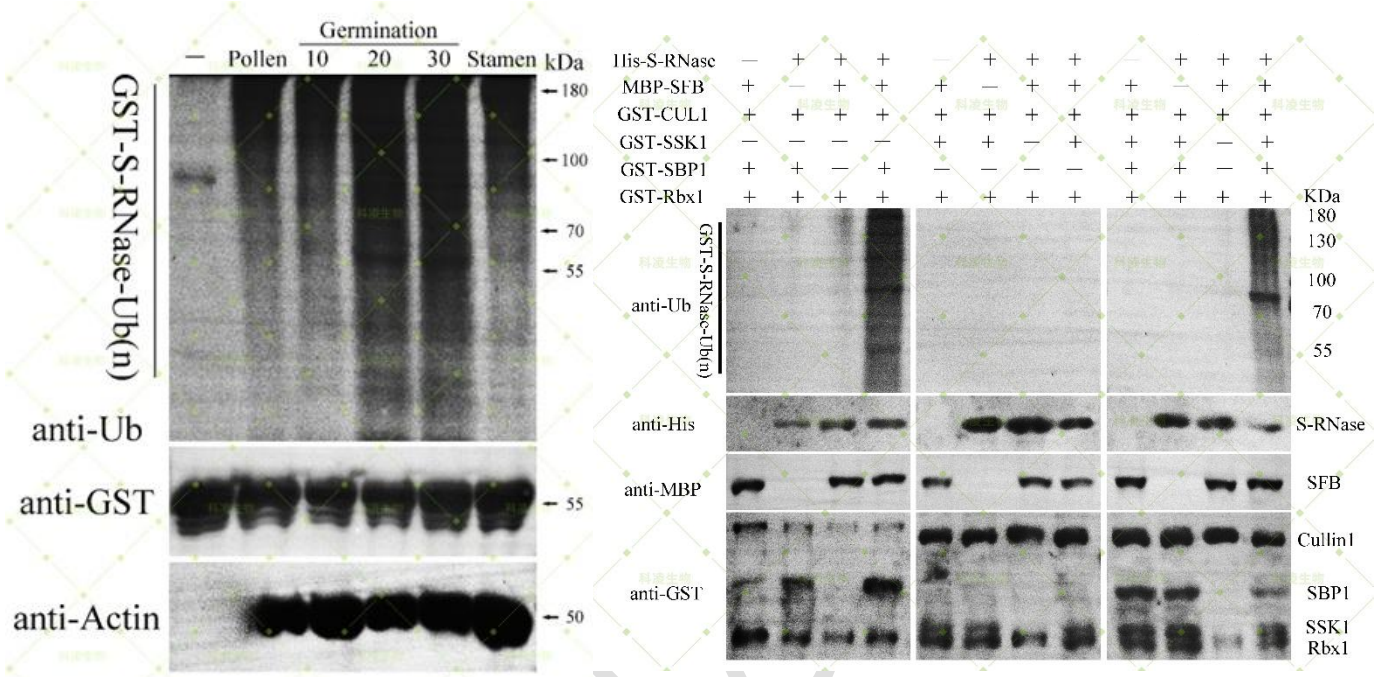
载体需要新鲜或甘油菌液体积大于 0.5 ml，冰袋运输；

质粒 DNA 体积大于 20 μl，浓度不低于 30ng/μl,，且主带明显无降解；

提供测序结果以及抗性；

如需我司构建载体，要求详见载体构建。

本司服务案例（以 GST 标签蛋白为例）：



结果初析：体内实验中，GST 抗体检测结果：混合样本有 WB 条带说明 S-RNase 蛋白原核表达成功。Actin 抗体检测结果：混合样本中有 WB 条带说明花粉活性总蛋白提取成功。Ubiquitin 抗体检测结果：反应后的 S-RNase 蛋白 WB 检测有明显的泛素化条带，说明花粉总蛋白可以使得 S-RNase 蛋白发生泛素化。同时，在花粉萌发和花粉管生长过程中，S-RNase 蛋白发生泛素化程度更高。体外实验结果显示，未加 SBP1 蛋白的反应体系未出现泛素化条带，而加入 SBP1 蛋白时出现了明显的泛素化条带，说明 SBP1 蛋白参与 S-RNase 蛋白的泛素化

25 荧光定量 PCR 检测基因表达量（相对/绝对）

技术简介：

荧光定量 PCR(Quantitative Real-time PCR，qPCR)是一种在 PCR 扩增反应体系中加入荧光基团，对扩增反应中每一个循环产物荧光信号的实时检测，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。相较于常规 PCR 而言，实时荧光定量 PCR 技术不仅实现了对 DNA/RNA 模板的定量分析，而且具有灵敏度和特异性高、能实现多重反应、自动化程度高、无污染、实时和准确等特点。目前实时荧光定量 PCR 技术正广泛应用于基因表达分析，等位基因分析，ChIP 结果分析，转基因生物检测等领域，成为最为重要的核酸扩增和检测手段之一。实时荧光定量 PCR 技术通常包括绝对荧光定量 PCR 和相对荧光定量 PCR。

应用范围：

1、检测不同组织样本的基因表达水平；

2、检测外源插入基因或者病毒拷贝数；

3、检测特殊 RNA 表达水平，如 microRNA、circRNA 等。

公司优势：

1、本司有特殊组织 RNA 提取技术，可获取高质量 RNA；

2、设计和合成两对定量引物，选取最优引物进行定量；

3、提供三个技术重复，保证操作稳定性。

服务流程：

实验信息确认—RNA 提取—定量引物设计—引物确认和荧光定量—结果交付。

结果交付：

标准实验报告，包括实验步骤与结果；

RNA 电泳图片；

提供扩增曲线，溶解曲线，机器原始数据；

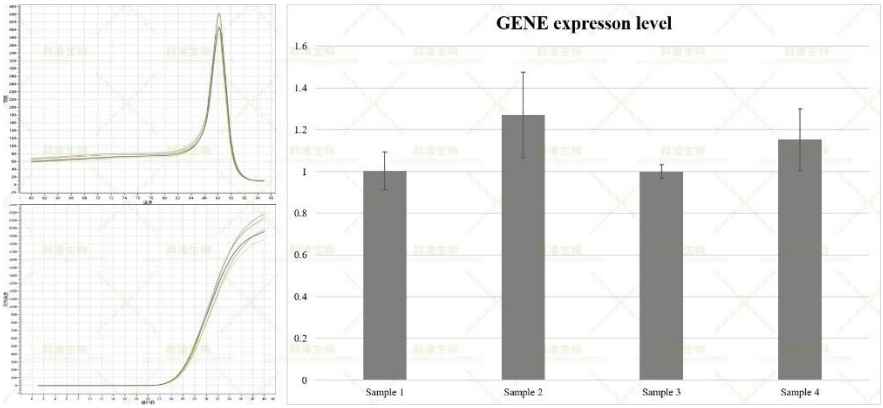
荧光定量数据处理柱状图。

送样要求：

组织样本需要干冰寄送，且质量不少于 0.5g；

提供检测序列和内参序列。

本司服务案例（以 SYBR 相对定量为例为例）：



26 转基因插入拷贝数检测（Southern Bolt）

技术简介：

Southern 杂交是对基因组 DNA 特定序列进行检测的常用方法，首先提取基因组并利用限制性内切酶消化 DNA，在琼脂糖凝胶上进行电泳分离，将 DNA 变性并在原位将单链 DNA 片段转移至尼龙膜或其他固相支持物上，经干烤或者紫外线照射固定，再与相对应结构的标记探针进行杂交，用放射自显影或酶反应显色，从而检测特定 DNA 分子的拷贝数。

应用范围：

1、检测转基因植株拷贝数；

2、进行 DNA 图谱分析。

公司优势：

1、使用地高辛标记探针，具有高灵敏度、低背景的有点；

2、使用多种限制性内切酶进行酶切检测，确保基因组完全酶切；

3、增加阳性对照，保证实验结果可靠。

服务流程：

咨询下单—样本寄送和探针确认—基因组酶切和探针 PCR 预实验—Southern 杂交—结果交付。

结果交付：

标准实验报告，包括实验步骤与结果；

基因组提取图、基因组酶切图、样本的探针 PCR 图、Southern 杂交图；

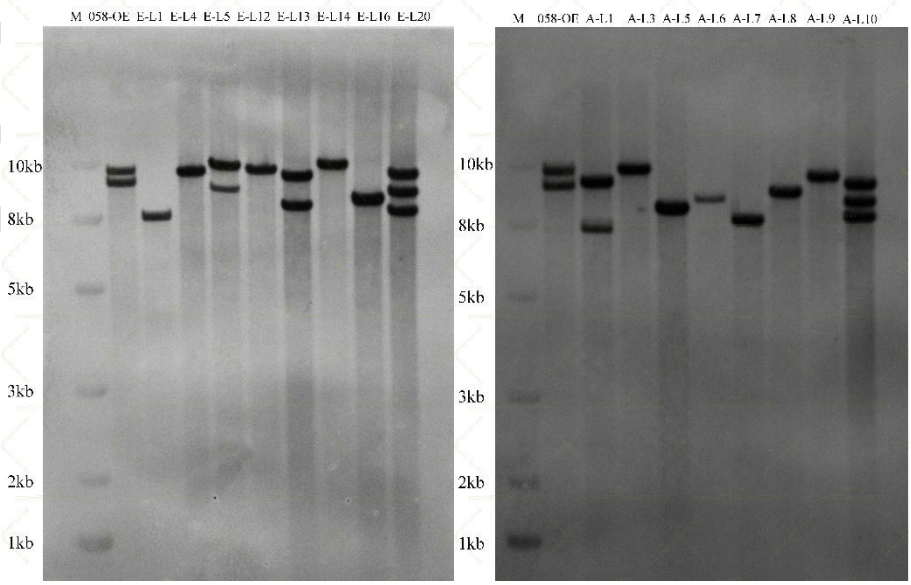
探针引物、扩增产物和杂交膜。

送样要求：

组织样本需要干冰寄送，且质量不少于 5g；

探针序列信息和阳性对照；

本司服务案例（以水稻叶片样本为例）：



27 植物组织 GUS 染色及活性检测

技术简介：

GUS 基因编码 β-葡萄糖醛酸乙酰转移酶，该酶可将 5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-葡萄糖苷酸酯（X-Gluc）水解生成蓝色产物。GUS 能与底物 4-甲基伞型酮-β-葡萄糖醛酸苷（MUG）反应产生荧光物质 4-甲基伞型酮（MU）。MU 的激发波长为 365nm，发射波长为 456nm，可使用酶标仪对其含量进行测定。

应用范围：

1、 稳定转化分析启动子在研究植物中的表达位置和表达强度；

2、 定性和定量分析启动子活性的强弱；

3、分析启动子的顺式作用元件。

公司优势：

1、本司有功能齐全的 *GUS* 报告载体及对应的阴阳性对照载体 ；

2、本司有多种植物稳定转化和瞬时转化技术，并可同时定性和定量检测 GUS 活性；

服务流程：

咨询下单—确定实验信息—载体构建—植物转化—GUS 活性检测—结果交付。

结果交付：

标准实验报告，包括实验步骤与结果；

GUS 染色图片及定量分析柱状图，瞬时转化附送阴阳性对照组；

发表级别的组图。

送样要求：

植物组织需要活体寄送；

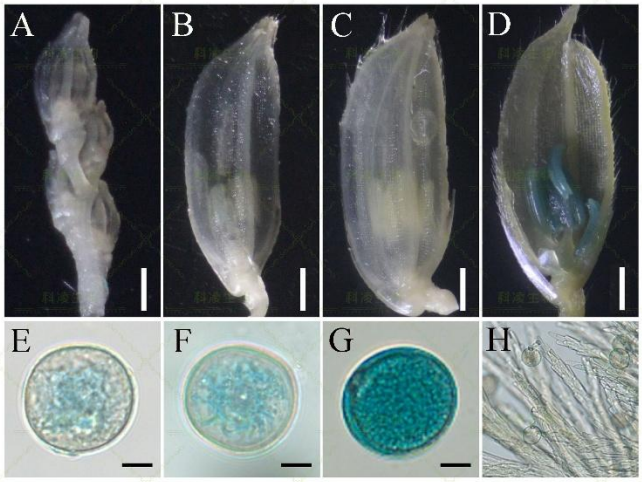
载体需要新鲜或甘油菌液体积大于 0.5 ml，冰袋运输；

质粒 DNA 体积大于 20 μl，浓度不低于 30ng/μl,，且主带明显无降解；

提供测序结果以及抗性；

如需我司构建载体，要求详见载体构建。

本司服务案例（以水稻小花为例）



武汉科凌生物

28 植物 VIGS 实验及生理指标检测

技术简介：

病毒诱导的基因沉默（virus induced gene silencing，VIGS）技术通过携带目标基因片段的重组病毒载体侵染植物，触发 RNA 干扰机制，特异性降解内源基因 mRNA 实现转录后基因沉默，该技术无需建立稳定遗传转化体系，适用于木薯、林木等遗传操作困难的物种。与传统的基因功能分析方法相比，VIGS 能够在侵染植物当代对目标基因进行沉默和功能分析，且具有沉默单个或多个基因家族成员的潜力。目前，烟草脆裂病毒（TRV）构建的 VIGS 体系是目前应用最为广泛的系统。由 pTRV2 质粒及其伴随质粒 pTRV1 组成。

应用范围：

1、可瞬时干扰目的基因表达；

2、适用于无稳定遗传转化体系物种；

公司优势：

1、本司具有多个物种组织培养条件和瞬时转化技术；

2、本司可代为观察和记录干扰后植物表型；

3、本司可进行相关的基因表达量和各生理指标检测。

服务流程：

咨询下单—样本寄送—VIGS 注射—表型观察和生理指标检测—结果交付。

结果交付：

标准实验报告，包括实验步骤与结果；

组织 VIGS 注射后表型观察图；

VIGS 基因和目的基因表达量的检测图；

生理指标检测结果。

送样要求：

植物组织需要活体寄送，或者寄送种子由本司代为种植；

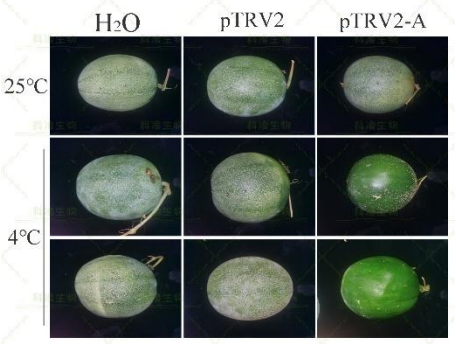
载体需要新鲜或甘油菌液体积大于 0.5 ml，冰袋运输；

质粒 DNA 体积大于 20 μl，浓度不低于 30ng/μl,，且主带明显无降解；

提供测序结果以及抗性；

如需我司构建载体，要求详见载体构建。

本司服务案例（以甜瓜为例）：



结果初析：对甜瓜 TPS 基因进行干扰并对果实进行低温检处理和表型观察，结果显示 TPS 基因表达量降低引起果实不耐低温。荧光定量检测显示目的基因表达量明显降低，相关抗逆基因表达量也有不同程度的上下调。对海藻糖(THL), 海藻糖-6-磷酸合酶(TPS), 海藻糖-6-磷酸酯酶(TPP)活性进行测定，显示这些抗逆酶类活性明显下降。

武汉科凌生物

29 植物胁迫处理及生理指标检测

技术简介：

非生物胁迫是非生物因素对特定环境中的生物体的负面影响，其不利于植物生存和生长发育甚至导致伤害、破坏和死。通常包括温度、干旱、盐渍、水淹、过量光、紫外线辐射，以及空气、土壤或水体污染如重金属、农药、臭氧和二氧化硫污染等。

应用范围：

1、研究非生物胁迫对植物生长的影响；

2、探究目的基因在非生物胁迫中的作用机理。

公司优势：

1、本司具有多个物种组织培养条件和转基因技术；

2、本司可代为观察胁迫处理后植物表型；

3、本司可进行相关的基因表达量和各生理指标检测。

服务流程：

咨询下单—样本寄送—转基因材料种植和检测—胁迫处理，表型观察和生理指标检测—结果交付。

结果交付：

标准实验报告，包括实验步骤与结果；

胁迫处理表型观察图；

基因表达量检测，生理指标检测结果。

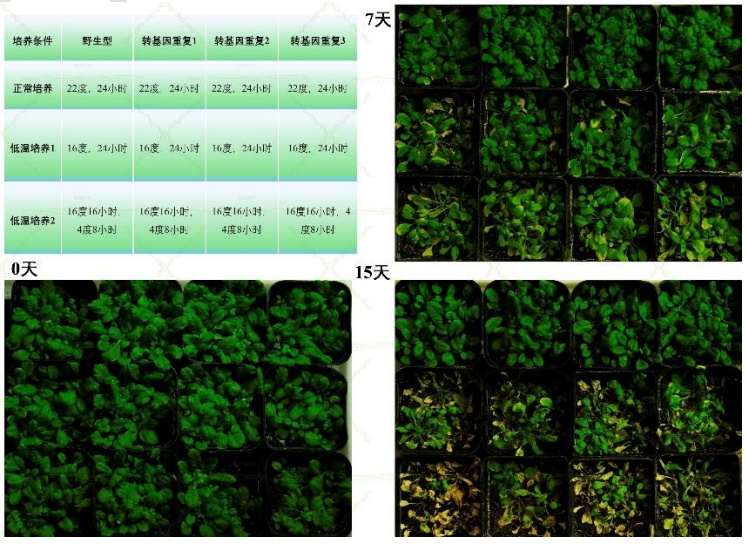
送样要求：

植物组织需要活体寄送，或者寄送种子由本司代为种植；

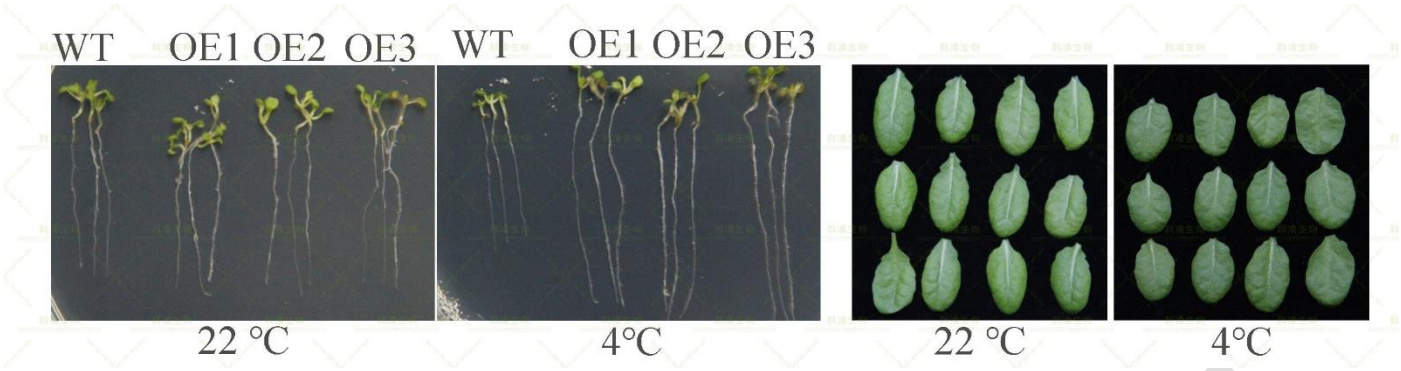
胁迫处理条件，检测指标，胁迫实验参考文献等。

本司服务案例（以拟南芥为例）：

培养条件	野生型	转基因重复1	转基因重复2	转基因重复3
正常培养	22度，24小时	22度，24小时	22度，24小时	22度，24小时
低温培养1	16度，24小时	16度，24小时	16度，24小时	16度，24小时
低温培养2	16度16小时，4度8小时	16度16小时，4度8小时	16度16小时，4度8小时	16度16小时，4度8小时

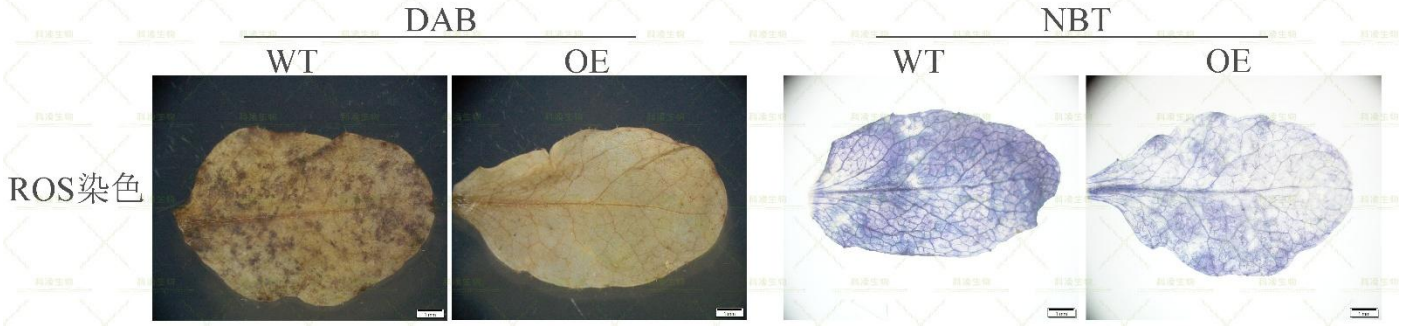


结果初析：将转基因植株进行种植和低温处理，植株存活率统计显示超表达植株比野生型的要高，说明目的基因存在抵抗低温胁迫的作用。

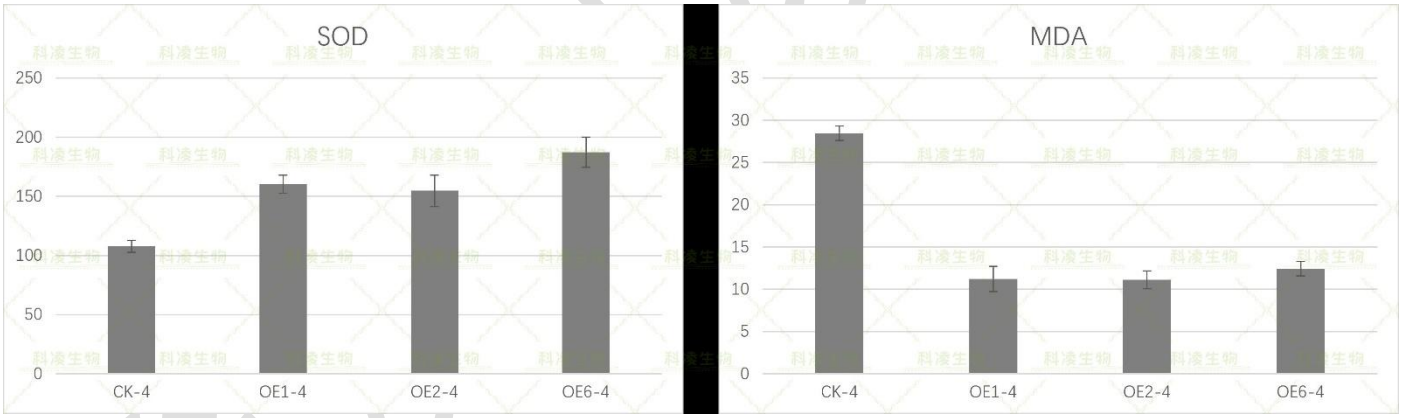


结果初析：低温处理情况下，转基因拟南芥植株根长和叶片大小明显超过野生型。

生理指标检测有：



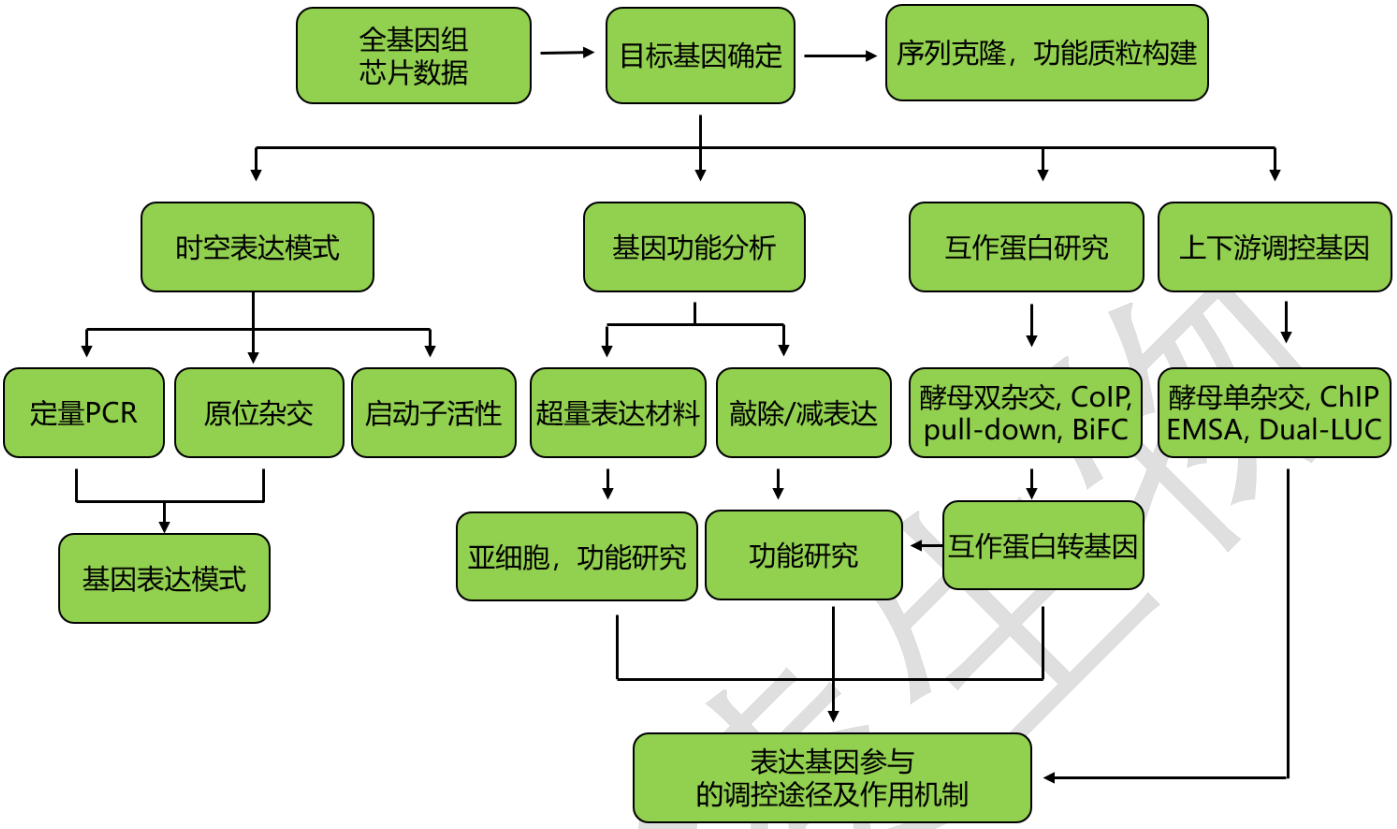
结果初析：低温处理后，超表达植株叶片的 ROS 水平明显低于野生型，说明其细胞受损程度更低。



结果初析：超氧化物歧化酶活性(SOD)含量的增加，会增强植株抵抗低温的能力。结果显示，在低温处理下转基因植株中的 SOD 含量高于野生型，说明转基因植株有一定的抗寒作用。丙二醛(MDA)含量是植物细胞膜质过氧化程度的体现，丙二醛含量高，说明植物细胞膜质过氧化程度高，细胞膜受到的伤害严重。结果显示，在低温处理下转基因植株中的丙二醛含量明显低于野生型植株，说明转基因植株有一定的抗寒作用。

同时，生理检测指标包括过氧化氢酶（CAT）、可溶性糖、脯氨酸（proline）、组织相对含水量、土壤含水量等。

30 项目合作与课题设计



武汉科凌生物