重组蛋白纯化原理及基本原则

产品名称	重组蛋白纯化原理及基本原则
公司名称	北京义翘神州科技股份有限公司
价格	.00/件
规格参数	
公司地址	北京市北京经济技术开发区科创十街18号院9号楼
联系电话	400-8909989 15101180634

产品详情

重组蛋白纯化基本原则

蛋白的分离纯化是生物工程下游阶段一个比较重要的部分，尤其在基因工程重组蛋白的分离纯化中，上游过程的许多因素会直接影响到下游蛋白的分离，充分利用上游对下游的影响，对蛋白的纯化做一个全面的考虑和整体的设计。是否带有亲和标签，His标签，GST标签等，不同的亲和标签选择不同的纯化方案；可能是可溶性表达，可能形成包涵体，可溶性的蛋白往往需要复杂的纯化步骤，而包涵体易于分离，纯度较高，但回收具有生物活性的蛋白却变的相当困难，需要对聚集的蛋白进行变复性，通常活性蛋白的得率比较低；是否对宿主细胞具有毒性，从而选择抗毒性的表达系统；怎样选择表达系统，是大肠杆菌表达系统，酵母表达系统还是CHO细胞表达系统，不同的表达系统和培养方法显著影响下游的处理过程，目标蛋白表达的定位（胞内、细胞内膜、周质空间和胞外），蛋白表达的量都依赖于所选择的表达系统；蛋白的化学性质，是否容易被蛋白酶降解，是否会和一些金属离子，化学成分发生反应；蛋白的物理性质，是否对温度敏感等。从蛋白基因的获取，蛋白基因的克隆，蛋白的表达，做好一个整体的规划，将对纯化工作的方便快捷高效带来关键的影响。

基因工程构建的纯化标记有很多，通过改变 cDNA在被表达的蛋白的氨基端或羧基端加入少许几个额外氨基酸，这个加入的标记可用来作为一个有效的纯化依据。GST融合载体，蛋白A融合载体，含组氨酸标记（Histidine-tagged）等，不同亲和标签的蛋白有不同的纯化方案。

选择亲和标签时需考虑的因素

亲和标签与目标蛋白之间的作用是相互的，需要综合的考虑，既要考虑到对目标蛋白结构功能的影响，又要考虑到对标签与其配体亲和作用的影响，以及实际的用途。

（1）亲和标签是否会影响到目标蛋白的结构和功能，大多数情况首要选择短的多肽标签，这是因为短的肽标签对目标蛋白的结构影响小，而大的亲和标签可能限制重组蛋白的折叠，影响蛋白质的生物学功能。

（2）亲和标签对蛋白质稳定性的影响，亲和标签的加入是否会影响到目标蛋白的正确折叠，是促进目标蛋白的可溶性，还是容易形成包涵体，会不会造成氨基酸C和N端破坏，使目的蛋白表达不完全。

（3）亲和标签所融合的位置，亲和标签可以加在N端，可以加在C端，也进行串联。多数情况下蛋白质的N端区域对蛋白质的功能不是太重要，所以在N端进行融合标签的融合常常能保留蛋白质的生物学功能。由于N端DNA序列对蛋白质的转录翻译影响较大，所以标签加在N端对蛋白质的表达水平影响更大，优化标签的mRNA结构可使表达水平提高。可能有些蛋白纯化后需要去除亲和标签C端融合在去除融合标签后在目标蛋白的C端会有几个氨基酸残留，而小心的选择剪切特异性的氨基酸序列就可以在去除N端亲和标签后得到天然的目标蛋白。

（4）亲和洗脱的条件，有些条件比较温和，而有些条件较为剧烈，选择的亲和表达系统应该不使目标蛋白变性。

样品的预处理

1.诱导方式:诱导方式的选择上，为了得到正确折叠的目的蛋白，表达菌种的生长情况，菌种是否健壮，是否是单克隆菌种，菌体的浓度是否适合诱导，生长状态不好的表达菌，一方面会造成目的蛋白的错误折叠，造成蛋白大小，形态等发生改变，另一方面会因为IPTG的加入，导致菌体的死亡或者降解。

低温度诱导有助于蛋白二硫键的正确折叠，但对于高温表达的蛋白不适合低温状态，温度过高容易导致包涵体的形成。

2.诱导剂：基因的诱导表达基于乳糖操纵子调节机制，没有乳糖存在的时候，阻碍物基因产生阻碍蛋白，阻碍蛋白和操纵子结合，抑制基因的表达；当有乳糖存在的时候，B-半乳糖苷酶和乳糖作用产生异半乳糖，异半乳糖和阻碍蛋白结合，解除抑制，激活基因，开始表达蛋白。诱导的浓度的高低对目的蛋白的表达也会有产生影响。BL21（DE3）, Rosetta(DE3)等大肠杆菌表达系统这些菌株都敲除了蛋白酶，并溶源了噬菌体DE3。DE3是的一种衍生λ噬菌体，带有噬菌体21抗性区和 lacI基因，lacUV5启动子，以及T7 RNA聚合酶基因。这一区段被插入int基因，因此阻止了DE3在没有辅助噬菌体时整合到染色体上或从染色体切出。一旦形成DE3溶原状态，就只有受IPTG诱导的lacUV5启动子指导T7
RNA聚合酶基因转录，在溶原培养体系中加入IPTG诱导T7
RNA聚合酶生产，继而质粒上的目的DNA开始转录。

3.抽提方式：进行破壁之前应该选择合适的缓冲组分， 合适的pH
要结合酸碱溶液的滴定调节，尽量低的离子强度
，加入一些稳定成分稳定成分，EDTA螯合重金属离子，Triton
X-100，NP40等表面活性剂，保护非极性表面等。

4.确定蛋白质样品的形态，浓度 黏度 体积。有时候得到粗蛋白的时候，会观是否符合目的蛋白的一些性质，确保得到是目标蛋白。粗蛋白的形态有没有明显的差异，浓度是否符合纯化的要求，是否有较多的干扰物质，核酸 色素 强结合成分。

5.优化表达条件

（1）重组蛋白不表达或者表达量低。如果重组蛋白不表达（包含体和可溶蛋白都没有）通过改变诱导剂浓度，诱导温度，时间等都不表达的时候，然后尝试更换菌株、质粒载体。

降低诱导后培养温度。重组蛋白表达得越慢，其折叠效果就越好，大肠杆菌在4°C时依然可以表达重组蛋白，而将培养温度降低至25-30°C就能显著改善蛋白折叠。此方法不适用于温度诱导的重组蛋白表达；

减少诱导剂。诱导剂浓度可以降低至1/10；选用Lac渗透酶缺陷型菌株，如Tuner、Rosetta等，也有很好的效果。这类菌株能够使进入每个细胞的诱导剂浓度相同。重组蛋白在所有细胞中的表达水平相当时，减

少诱导剂的效果更好。

（2）检查密码子构成，使其适应宿主菌的密码子偏好。稀有密码子，尤其是位于重组蛋白N端的和大量集中的稀有密码子，会降低mRNA稳定性，显著降低翻译速度，引起翻译提前中止、翻译移码和突变。将这些稀有密码子（尤其是N端！）突变为宿主偏好的密码子，能够显著提高表达水平。改善蛋白稳定性。能够引起蛋白降解的因素很多，从蛋白自身性质到宿主性质不一而足，如果重组蛋白在表达时就被降解，表达量和稳定性就会受到很大影响。在大肠杆菌中表达重组蛋白，需要牢记N端法则：当N端第二个残基是Leu、Arg、Lys、Phe、Tyr和Trp时，重组蛋白半衰期只有2分钟，而小侧链的氨基酸残基，如Ala，则可以提高蛋白稳定性。因此在设计载体时，要特别注意第二个密码子，避免上述残基的出现。

处理高毒性蛋白：毒性极高的重组蛋白，其本底表达就会杀死原核宿主，质粒容易丢失，使其在大肠杆菌中很难得到高表达。采用可表达T7溶菌酶的宿主。T7溶菌酶是T7RNA聚合酶的抑制剂，采用含有T7溶菌酶质粒的宿主，如pLysS，可以降低重组蛋白在大肠杆菌快速生长期的本底表达量，在受到IPTG诱导时也能较好的表达蛋白。

（3）包涵体表达：包涵体蛋白折叠混乱、二硫键配对混乱、没有生物活性、变复性条件需要长时间摸索等，即使包涵体蛋白成功复性，其均一性和活性依然备受质疑。但是包涵体表达也有其优势：能够很轻松的获得超高的表达量，不可溶的重组蛋白不会被宿主内的蛋白酶降解，重组蛋白的毒性被大大抑制，杂蛋白含量低（~10%），容易纯化等。由于这些优点以及蛋白质复性条件的不断发展，表达包涵体蛋白逐渐为人们所接受，成为重组蛋白表达的一个常用方案。与可溶蛋白相反，提高培养温度、延长培养时间、在较高的菌密度下诱导都有利于包涵体的形成；在破菌和变性溶解时加入还原剂能够打开错配的二硫键；在复性液中加入二硫键异构酶、脯氨酸异构酶、分子伴侣和蛋白的辅助因子可以帮助重组蛋白折叠；精氨酸和高分子量PEG能减轻蛋白分子的聚集；尝试多种物理手段，如透析、快速稀释和柱上复性等，有时对复性有奇效。包涵体的表达相对简单，但其复性过程仍是依赖经验的，没有通用的方法可以套用。

义翘神州重组蛋白纯化服务类型：https://cn.sinobiological.com/services/recombinant-protein-expression-service