

蛋白纯化标签选择

体外重组蛋白表达技术已经渗透到生物学的各个领域。目前，体外重组蛋白表达系统主要有四类：原核表达系统、哺乳动物细胞表达、酵母表达系统及昆虫细胞表达。表达的一般实验包括载体构建-表达鉴定-蛋白纯化三大步骤。在构建载体阶段，除了一些必要的表达元件，还需要考虑的密码子优化和标签的选择。选择合适的标签不但有利于蛋白的纯化，促进蛋白的可溶性，同时也不能影响蛋白的结构功能和下游应用。本文详细介绍了几种蛋白纯化标签，帮助我们更好的设计实验。

蛋白纯化标签比较

融合标签	大小 (KD)	功能	是否切除
HIS	0.84	有利纯化，能纯化可溶性/包涵体蛋白	标签小，对蛋白无影响
GST	26	增强蛋白可溶性，仅能纯化可溶性蛋白，屏蔽毒性蛋白	
MBP	44.4	增强蛋白可溶性，屏蔽毒性蛋白	标签较大，影响较大
NusA	55	增强蛋白可溶性，屏蔽毒性蛋白	
SUMO	11.2	增强可溶性，屏蔽毒性蛋白	

表 1：各个标签性能对比表

HIS-Tag (组氨酸标签)

HIS-Tag 蛋白纯化的首选标签

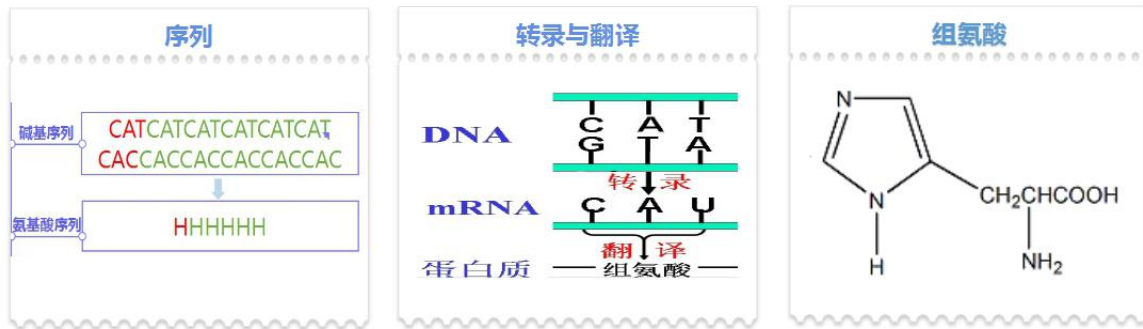
HIS-Tag 本身的特性对目的蛋白没有影响，不会形成二聚体；

分子量较小，只有 0.84KD，对蛋白的下游应用不会产生影响；

免疫原性低，可将纯化的蛋白直接注射动物进行免疫并制备抗体；

HIS-Tag 与细菌的转录翻译机制兼容，有利于蛋白表达；

可与其他标签构建双标签表达，可用于多种蛋白表达系统，纯化条件温和对蛋白影响较小。



HIS-Tag 由 6-10 个组氨酸残基组成，分子量不到 0.84KD，通常插入在目的蛋白的 C 末端或 N 末端。HIS-Tag 是目前原核表达最常用的标签，蛋白纯化完之后可以不需切除此标签，也不会对蛋白产生功能影响。同时，蛋白纯化步骤简便，纯化条件温和，对蛋白也不会产生太大影响。

GST-Tag (谷胱甘肽巯基转移酶标签)

GST-Tag 相对分子质量较大 约为 26KD 插入在目的蛋白的 C 末端或 N 末端，大肠杆菌中常用在 N 端。GST(谷胱甘肽巯基转移酶) 蛋白本身是一个在解毒过程中起到重要作用的转移酶。一般选择 GST 标签的目的有两个，一是提高蛋白表达的可溶性，二是提高蛋白的表达量。蛋白表达纯化结束后需根据不同的蛋白应用而确定是否切除标签，标签较大，切除与否需根据下游应用考虑。如果要去除 GST 融合部分，可用位点特异性蛋白酶切除。检测方法可用 GST 抗体或表达的目的蛋白特异性抗体检测。

GST 的序列：

碱基序列	<pre> 1 ATGTCCCCTA TACTAGGTTA TTGAAAATT AAGGGCCTTG TGCAACCCAC TCGACTTCTT 61 TTGGAATATC TTGAAGAAAA ATATGAAGAG CATTGTATG AGCGCGATGA AGGTGATAAA 121 TGGCGAAACA AAAAGTTTGA ATTGGGTTTG GAGTTTCCCA ATCTTCCTTA TTATATTGAT 181 GGTGATGTTA AATTAACACA GTCTATGGCC ATCATACGTT ATATAGCTGA CAAGCACAAC 241 ATGTTGGGTG GTTGTCCAAA AGAGCGTGCA GAGATTCAA TGCTTGAAGG AGCGGTTTTG 301 GATATTAGAT ACGGTGTTTC GAGAATTGCA TATAGTAAAG ACTTTGAAAC TCTCAAAGTT 361 GATTTTCTTA GCAAGCTACC TGAAATGCTG AAAATGTTTCG AAGATCGTTT ATGCATAAAA 421 ACATATTTAA ATGGTGATCA TGAACCCAT CCTGACTTCA TGTGTATGA CGCTCTTGAT 481 GTTGTTTTAT ACATGGACCC AATGTGCCTG GATGCGTTCC CAAAATTAGT TTGTTTTAAA 541 AAACGTATTG AAGCTATCCC ACAAATTGAT AAGTACTTGA AATCCAGCAA GTATATAGCA 601 TGGCCTTTCG AGGGCTGGCA AGCCACGTTT GGTGGTGGCG ACCATCCTCC AAAATCGGAT 661 CTGGTCCCGC GTGGATCCCC GGAATTCCCG GGTCGACTCG AGCGGCCGCA TCGTGACTGA </pre>
氨基酸序列	<pre> 1 MSPILGYWKI KGLVQPTRLL LEYLEEKYEE HLYRDEGDK WRNKKFELGL EFPNLPYYID 61 GDVKLTQ SMA IIRYADKHN MLGGCPKERA EISMLEGAVL DIRYGVSRIA YSKDFETLKV 121 DFLSKLP EMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMILDALDVLVLYMDPMCLDAFPLKLVCFK 181 KR IEAIPQID KYLKSSKYIA WPLQGWQATF GGGDHPPK </pre>

GST-Tag 的优缺点

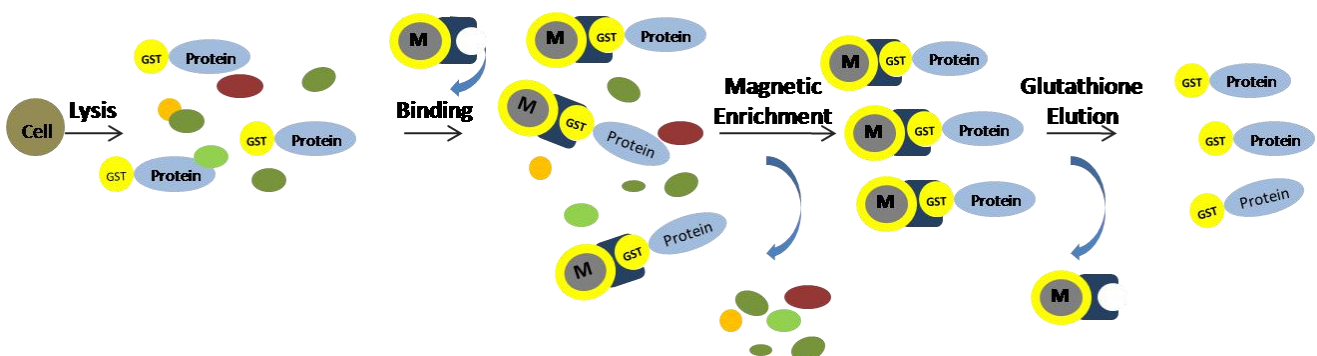
- 增加外源蛋白的可溶性；
- 可在不同的宿主中表达，适用范围广；
- 可用不同的蛋白酶可以方便去除；
- 很好保留了蛋白的抗原性和生物活性，提高外原蛋白的稳定性；
- 高特异性，纯化方便且温和；
- 分子量较大，可能会影响蛋白质的功能和下游实验；
- 如果蛋白不可溶，很难用变性的方法纯化。

GST 亲和纯化原理

GST 亲和层析是利用 GST 融合蛋白与固定的谷胱甘肽(GSH)通过硫键共价亲和，通过 GSH 交换洗脱的原理来进行纯化。该纯化柱中，凝胶手臂上通过硫键结合一个谷胱甘肽。然后利用谷胱甘肽与谷胱甘肽巯基转移酶（即 GST-tag (26 KDa)）之间酶和底物的特异性作用力，使得带 GST 标签的融合蛋白能够与凝胶上的手臂谷胱甘肽结合，从而将带标签的蛋白与其他蛋白分离开。谷胱甘肽通常有氧化型 GSSG 和还原型 GSH，当我们使用 GSH 洗脱时，GSH 会与凝胶上的谷胱甘肽竞争结合融合蛋白，从而将目标蛋白洗脱。

GST 标签蛋白可直接从细菌裂解液中利用含有还原型谷胱甘肽琼脂糖凝胶（Glutathione sepharose）亲和树脂进行纯化。GST 标签蛋白可在温和、非变性条件下洗脱，因此保留了蛋白的抗原性和生物活性。GST 在变性条件下会失去对谷胱甘肽树脂的结合能力，因此不能在纯化缓冲液中加入强变性剂如：盐酸胍或尿素等。如果蛋白表达在包涵体中，可复性后再纯化。此外要去除 GST 标签，可用位点特异性蛋白酶切除。

GST 蛋白纯化流程图：



MBP-Tag (麦芽糖结合蛋白标签)

MBP (麦芽糖结合蛋白 maltose binding protein) , 残基数 346 , 分子量 42.5KDa , 由大肠杆菌 K12 的 malE 基因编码 , 构建时刻放在 N 端 , 用来提高可溶性 (尤其是真核蛋白) 。 MBP 的折叠需要 DnaK-DnaJ-GrpE 和 GroEL-GeoES 两个分子伴侣系统的帮助 , 这可以使这些分子伴侣聚集到目的蛋白的附近帮助其正确折叠。另外 , 以标签蛋白形式存在的麦芽糖结合蛋白可以减少目的蛋白的降解 , 提高表达产物的水溶性 , 也为以后对目的蛋白的纯化提供了基础。麦芽糖结合蛋白能够被多糖树脂吸附 , 因此在过柱时 , 能够使融合蛋白与其它蛋白成份分离。

MBP 标签的优缺点

- 简单亲和纯化即可实现 ;
- 增加蛋白表达量和蛋白稳定性 ;
- 促进蛋白的可溶性和正确折叠 ;
- 标签较大 , 对蛋白的结构/功能会有一些影响。

NusA-Tag (转录终止/抗终止蛋白标签)

NusA 是大肠杆菌自身的一种蛋白 , 即转录抗终止因子 , 残基数 495 , 分子量 54.87KDa , 由 1999 年 Davia 将 NusA 从 4000 种大肠杆菌蛋白库中筛得。 NusA 不具有独立的纯化标签功能 , 所以要与其它标签 (如 His 标签) 联用。利用原核表达时 , NusA 标签可以明显的提高蛋白的可溶性 , 例如含有 NusA 标签的人白介素-3 融合蛋白 (NusA/hIL-3) 在 37°C 条件下诱导表达几乎全部可溶 (97%) , 而当其单独表达或融合 GST 标签表达时都是包涵体形式。另外 NusA 标签还可以提高不溶性靶蛋白如牛生长激素 (bGH) 、 人干扰素- γ (hIFN- γ) 的可溶性。来自草木犀根瘤菌 (*Rizobium meliloti*) 的酪氨酸激酶因为分子量大 (超过 54kDa) 并且基因含有大量稀有密码子 , 自身在大肠杆菌中无法过量表达 , 但是与 NusA 融合后却可以高效表达。

NusA 氨基酸序列 :

NusA Protein Length=495 MW=54897.3 Predicted pI=4.24

```
1 mnkeilavve avsnkalpr ekifealesa lata tkkkye qeidvrveid rksgdfdtfr
61 rwlvvevtq ptreitleaa rfedesmnvg dyvedqiesv tfdrittqta kqvivqkvre
121 aeramvvdqf rehegeiitg vvkknrdni tldlgnaea vilredmlpr enfrpgdrir
181 gvlyavrpea rgaqlfvtrs kpemliel fr ievpeigeev leikaaardp gsrakiavkt
241 ndkridpvga cvgmrgarvq avstelgger idivlwdndp aqfvinamap advasivvde
301 dkhtmdiaive agnlaqagr ngqnvrlasq lsgwelnvt vddlqakhqa eahaaidtft
361 kyl didedfa tvlveegfss leelayvpmk elleidglde atvealrera knalttlala
421 qeeslgdnkp addllnleql drala fklaa rgvctledla eqgvddladi egmtdekage
481 limaarnicw fgdea
```

NusA 的优缺点

- 可以提高蛋白质的溶解性，可选的标签有 NusA，MBP，GST；
- 这些标签不能用专门的亲和基质纯化，融合蛋白构建时必须与可用于纯化的小亲和标签连用。尤其是当 NusA 蛋白增加融合蛋白溶解性时，一些在大肠杆菌中表达为不溶性的蛋白在与 NusA 在 N 端融合时则变成可溶。但是由于它的分子量较大，导致靶蛋白的得率相对降低；
- NusA 本身不具有独立的纯化标签功能，所以要与其它标签如 His 标签联用；
- NusA 对蛋白下游应用会有影响，如蛋白需进行结构分析（晶体衍射或核磁共振）。

SUMO (小泛素相关修饰物)

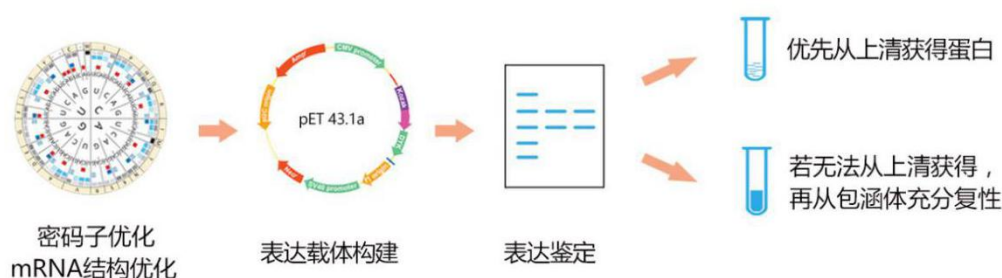
SUMO 标签蛋白是一种小分子泛素相关修饰蛋白，是存在于真核生物中高度保守的参与蛋白质小泛素化相关修饰的一类大蛋白。与 GST、MBP 或 NusA 相比，SUMO 不仅可以作为重组蛋白表达的融合标签还具备分子伴侣的功能，能促进蛋白的正确折叠，对热和蛋白酶具有耐受性，更有助于保持目的蛋白的稳定性。此外，SUMO 标签有着与其配套的蛋白酶（专一性强），此蛋白酶识别的是 SUMO 的三级结构，切割的特异性极高，不存在任何氨基酸的残留，因此适用于重组蛋白表达。

南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

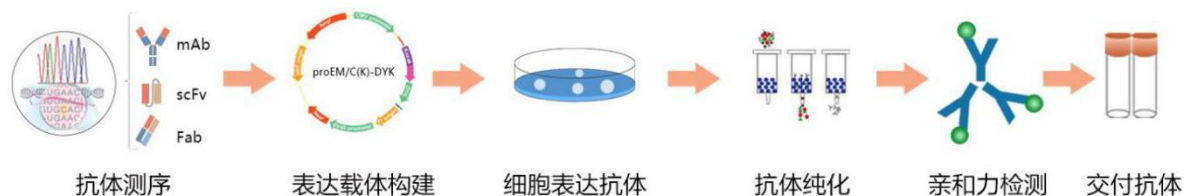
一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



二、蛋白表达（大肠杆菌表达）成功率>95%，不成功不收费，成功有保障



三、重组抗体表达 若想改造一个抗体，可以试试重组表达



四、稳定细胞系构建 研究级细胞系构建 & 高表达细胞株开发

