

包涵体复性注意事项和常见问题解析

包涵体复性注意事项

1. 最适 pH 值范围为 8.0-9.0 之间；
2. 温度适宜选择 4°C；
3. 复性时间一般为 24-36 小时；
4. 低分子化合物 如 L-Arg 有助于增加复性中间产物的溶解度；脲、盐酸胍、烷基脲、以及碳酸酰胺类等，在非变性浓度下是很有效的促进剂，都可阻止蛋白聚集；Tris 对蛋白质复性有促进作用；EDTA 可以防止蛋白降解；
5. 首先要获得较高纯度的包涵体；
6. 包涵体溶解要彻底，一般应使溶解液体量较大，不要怕蛋白被稀释，要有助溶措施；
7. 透析前后均要离心；
8. 包含体要彻底洗涤干净，洗涤液中加入适量 Triton-X100；
9. 包含体溶解后装入透析袋在复性液中复性；
10. 复性完毕在低浓度的缓冲液中连续缓慢透析 12-24h；
11. 复性率的测定时要据变性蛋白和非变性蛋白的光学性质不同测定
12. TritonX100、SDS 这一类去垢剂最后不易去除，在制药行业中一般不允许采用。用 Triton 洗涤有些包涵体效果不是很好。包涵体洗涤是纯化极为重要的一步，改变培养条件，再洗涤包涵体，有时可以在上柱前已经只剩下 3-4 条杂带，这样后续的纯化就很方便了。
13. 复性时的蛋白浓度一般为 0.1-1.0mg/ml，太高的浓度容易形成聚体沉淀，太低的浓度不经济，而且很多蛋白在低浓度时不稳定，很容易变性。

包涵体复性常见问题分析

包涵体复性原则

低浓度，平缓梯度，低温。

怎样洗涤包涵体？

通常的洗涤方法一般是洗不干净的，可以先把包涵体用 6M 盐酸胍溶解充分，过滤除去未溶解的物质，注意留样跑电泳，然后用水稀释到 4M，离心把沉淀和上清分别跑电泳，如此类推可以一直稀释到合适的浓度，可以找到一个合适去除杂质的办法，其实这就是梯度沉淀的方法，比通常的直接洗脱效果好。

对于尿素和盐酸胍该怎么选择

尿素和盐酸胍属中强度变性剂，易经透析和超滤除去。它们对包涵体氢键有较强的可逆性变性作用，所需浓度尿素 8-10M，盐酸胍 6-8M。尿素溶解包涵体较盐酸胍慢而弱，溶解度为 70-90%，尿素在作用时间较长或温度较高时会裂解形成氰酸盐，对重组蛋白质的氨基进行共价修饰，但用尿素溶解具有不电离，呈中性，成本低，蛋白质复性后除去不会造成大量蛋白质沉淀以及溶解的包涵体可选用多种色谱法纯化等优点，故目前已被广泛采用。

盐酸胍溶解能力达 95%以上，且溶解作用快而不造成重组蛋白质的共价修饰。但它也有成本高、在酸性条件下易产生沉淀、复性后除去可能造成大量蛋白质沉淀和对蛋白质离子交换色谱有干扰等缺点。

8M 尿素溶解的包涵体溶液应如何保存？

在 4 度放置半个月，都没什么问题。在室温放置超过 48 小时，可能会对目的蛋白有影响，因为尿素在碱性条件下可使一些氨基酸酰基化，所以早些处理 BI 溶液比较好。

复性时的蛋白浓度

一般使用浓度为 0.1-1.0mg/ml，太高的浓度容易形成聚体沉淀，太低的浓度不经济，而且很多蛋白在低浓度时不稳定，很容易变性。

蛋白复性后浓度低

蛋白可能是在复性的过程中发生降解了。

可以将复性好的蛋白浓缩一下跑胶看看。复性过程一般都是低浓度蛋白，需要保证分子间有足够的折叠空间。一些未正确折叠的蛋白就存在于沉淀中，可能沉淀看不出来，复性后的蛋白高速离心看看。

复性中蛋白析出是怎么回事？该怎么处理？

出现蛋白析出，肯定是条件变化太剧烈了。

复性应该采取复性液浓度和 PH 值逐渐变化的方法，例如根据包涵体的溶液成分，每隔 1 个 PH 或浓度值配置一种溶液，逐步透析到正常。此外透析时必须浓度极低，条件温和，使蛋白质能够正确折叠。但是复性的比率应该很低。

若加变性剂尿素可加到 2M，盐酸胍可加到 1-1.5M；

另外可将甘油浓度增加，范围可在 $\leq 30\%$ ，且在复性样品中也可加适量甘油。

复性效果的检测

根据具体的蛋白性质和需要，可以从生化、免疫、物理性质等方面对蛋白质的复性效率进行检测。

凝胶电泳：一般可以用非变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳可以检测变性和天然状态的蛋白质，或用非还原的聚丙烯酰胺电泳检测有二硫键的蛋白复性后二硫键的配对情况。

1. 光谱学方法：可以用紫外差光谱、荧光光谱、圆二色性光谱（CD）等，利用两种状态下的光谱学特征进行复性情况的检测，但一般只用于复性研究中的过程检测。
2. 色谱方法：如 IEX、RP-HPLC、CE 等，由于两种状态的蛋白色谱行为不同。
3. 生物学活性及比活测定：一般用细胞方法或生化方法进行测定，较好的反映了复性蛋白的活性，值得注意的是，不同的测活方法测得的结果不同，而且常常不能完全反映体内活性。
4. 黏度和浊度测定：复性后的蛋白溶解度增加，变性状态时由于疏水残基暴露，一般水溶性很差，大多形成可见的沉淀析出。
5. 免疫学方法：如 ELISA、WESTERN 等，特别是对结构决定簇的抗体检验，比较真实的反映了蛋白质的折叠状态。

变性的融合蛋白可以制备多抗或者单抗吗？

变性蛋白只是天然蛋白伸直的了产物，用来免疫动物具有更强的抗原性。只是天然蛋白中被包在内部的抗原决定簇也会暴露出来，如果用该变性抗原制备的抗体来检测变性抗原是可以的，如果用来检测天然蛋白，可能会有假阳性。做单抗也可以，同样道理，筛选出的单抗可能对抗的抗原决定簇处于天然抗原的内部，是否能用还要看将来该单抗用来干什么。

纯化后的可溶性融合蛋白可以直接用于制备多抗吗？

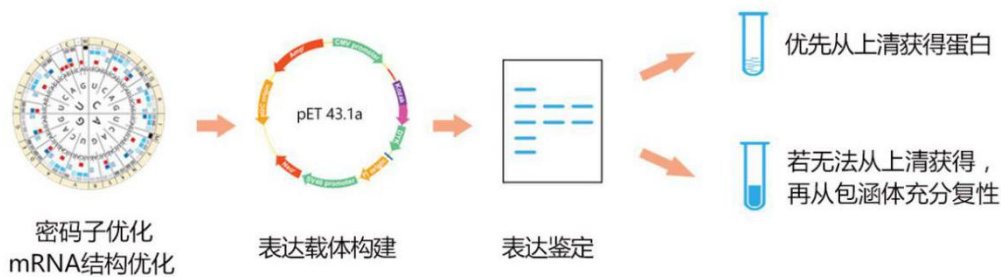
免疫动物要求抗原体种尽量小。在这种小体积的情况下，缓冲液里的小分子成分只要没毒影响就不大，可以不用考虑。

南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

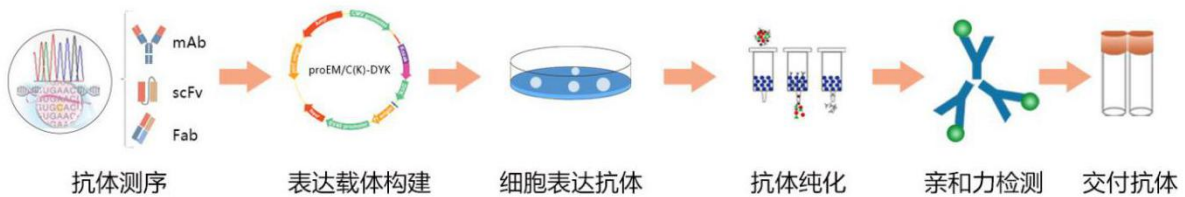
一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



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

