

## 包涵体纯化蛋白复性操作流程

### 包涵体的纯化和复性总结

包涵体折叠复性的方法应具备以下几个特点：较高的活性蛋白质回收率；复性产物易于与错误折叠蛋白质分离；折叠复性后能够得到较高浓度的蛋白；折叠复性方法易于放大等。蛋白复性的过程通常分为以下几个步骤：

#### 包涵体的洗涤

包涵体在溶解之前需要进行洗涤，包涵体中主要含有重组蛋白，但也有一些杂质，如一些外膜蛋白、质粒 DNA 等，这些杂质会与包涵体粘连在一起，可以通过洗涤去除大多数杂质，但无法将杂蛋白去除干净。

包涵体的洗涤通常选用浓度较低的变性剂，如 2M 尿素在 50mM Tris, pH7.0-8.5, 1mM EDTA 中洗涤包涵体。此外可以用温和去垢剂 TritonX-100 洗涤去除膜碎片和膜蛋白。同时，因为去垢剂的洗涤能力会随溶液离子强度升高而加强，所以在洗涤包涵体时可加入低浓度的尿素或高浓度的 NaCl，使包涵体的纯度达到 50%以上。

#### 包涵体的溶解

变性剂如尿素、盐酸胍，主要是通过离子间的相互作用，打断包涵体蛋白分子间的各种化学键，使多肽延伸。盐酸胍是较尿素强的变性剂，它能溶解尿素不溶的包涵体。SDS、正十六烷基三甲基铵氯化物、Sarkosyl 等也可以破坏蛋白内的疏水键，溶解一些包涵体蛋白质。

另外，从某些含有半胱氨酸的蛋白质中分离出的包涵体，通常含有一些链间形成的二硫键和链内的非活性二硫键，这就还需加入还原剂，如巯基乙醇、二巯基苏糖醇（DTT）、二巯赤藓糖醇、半胱氨酸等。这种还原性试剂能够同半胱氨酸形成各种二硫化物中间体，也会被复性用的二硫化物置换试剂所取代。二硫键的形成和断裂是可逆的，直到最有利的蛋白二硫键形成，这个平衡才会被破坏。

---

#### 常用变性剂对比

---

尿素	较盐酸胍慢而弱，溶解度为 70-90% (8-10M)	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 溶解的包涵体可选用多种色谱法纯化
盐酸胍	溶解能力达 95%以上，且溶解作	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

(6-8M) 用快而不造成重组蛋白质的共价 蛋白质沉淀

修饰

对蛋白质离子交换色谱有干扰

## 包涵体的复性

复性是指通过去除变性剂使目标蛋白从完全伸展的变性状态恢复到正常的折叠结构，同时去除还原剂确保二硫键正常形成。一般在尿素浓度 4M 左右时复性过程开始，到 2M 左右时结束；盐酸胍可以从 4M 开始，到 1.5M 时结束。

复性方法主要采用稀释复性，透析复性和柱上复性，具体对比如下：

复性技术	简介	优点	缺点
稀释复性	用折叠缓冲液快速稀释溶解的包涵体蛋白质溶液，达到降低变性剂浓度的目的，使去折叠的蛋白质进行再折叠	简单	慢 蛋白会被稀释到很低浓度 体积增加较大，变性剂稀释速度太快，不易控制
透析复性	通过逐渐降低外透液浓度来控制变性剂去除速度	简单 不增加体积	慢 使用大量缓冲液 不适合大规模操作，无法应用到生产规模
分子筛层析	分子筛效应可将蛋白质和小分子变性剂分离，实现溶液交换和蛋白质的折叠	在一步操作中直接进行自动化复性并纯化	样品体积受限
离子交换层析	减少导致蛋白质聚集的分子间相互作用，可将蛋白质结合在分离介质上，达到溶液中变性剂浓度的稀释和蛋白质的折叠	快速并简单 直接进行自动化	应避免使用与离子交换自相反电荷的添加剂

## 复性的检测

根据具体的蛋白质性质和需要，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。

1. 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。

2. 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。
3. 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。
4. 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。
5. 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。
6. 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。

## 蛋白复性过程的添加剂

1. 共溶剂：如 PEG6000-20000，据说可以可逆的修饰折叠中间体的疏水集团，此外由于阻止了蛋白质分子间的相互接触的机会，也可能对复性效率的提高起作用。一般的使用浓度在 0.1%左右，具体条件可根据实验条件确定。
2. 二硫键异构酶（PDI）和脯氨酸异构酶（PPI）：PDI 可以使错配的二硫键打开并重新组合，从而有利于恢复到正常的结构，此外在复性过程中蛋白质的脯氨酸两种构象间的转变需要较高能量，常常是复性过程中的限速步骤，而 PPI 的作用是促进两种构象间的转变，从而促进复性的进行。
3. 分子伴侣，即热休克蛋白（HSP），是一种没有蛋白质特异性的促进折叠的蛋白因子，研究发现很多蛋白在缺乏分子伴侣时无法自己正确的折叠。有人构建了与伴侣分子共同表达的菌株，据说效果不错。不过在生产中还没有看到 2 和 3 的应用的例子。
4. 0.4-0.6ML-Arg：成功的应用于很多蛋白如 t-PA 的复性中，可以抑制二聚体的形成。
5. 甘油：增加黏度，减少分子碰撞机会，一般使用浓度在 5%-30%。
6. 辅助因子：添加蛋白质活性状态必须的辅助因子如辅酶辅基等或蛋白配体等很多时候对蛋白质正确的折叠是有利的。 色谱法：通过将目标蛋白结合到层析柱上，减少蛋白分子间的相互影响，该方法得到越来越多的应用，常用的色谱有 SEC、HIC、IEC、IMAC 等。

## 案例介绍

## 包涵体沉淀的溶解、重折叠和离子交换层析

### 材料和设备

Tiss-Tearor?匀浆器

透析袋 ( Spectra/Por?6 )

阳离子交换柱

SDS-PAGE 电泳装置

### 试剂

缓冲液 A ( 1000mL )

1mol/L Tris-HCl ( PH 7.9 ) 50mL , 50mmol/L

0.5mol/L EDTA 1mL , 0.5mmol/L

5mol/L NaCl 10ml , 50mmol/L

甘油 50mL , 5%

缓冲液 A+50%甘油

脱氧胆酸钠 ( DOC )

N-十二烷基胺酸钠 ( SKL )

### 操作程序

#### 用 N-十二烷基胺酸钠溶解包涵体沉淀

1. 加 18mL 缓冲液 A 和 2mL 20% DOC 储存于包涵体沉淀中。用组织破碎器充分重悬沉淀，室温下静置至少 10min。
2. 悬液于 4°C、13000r/min 离心 10min。弃去上清（注意留样，样品 C），为确保沉淀得到充分洗涤，再次按步骤一的操作重悬沉淀。将悬液分成两个相等的部分，编号#1 和#2，于 4°C、13000r/min 离心 10min。
3. 对#1 管中的沉淀，加 19.7mL 的缓冲液 A 和 0.3mL 的 20%SKL 储液。剧烈搅动使沉淀慢慢溶解。然后静置 30min。
4. #1 管中溶解的蛋白悬液，置于 4°C、13000r/min 离心 10min。收集上清液，弃去沉淀。

### 透析除去去污剂使可溶性蛋白重折叠

1. 对溶解的物料进行蛋白定量测定(制作标准曲线时,必需用含有 0.3% SKL 的牛血清蛋白)。用缓冲液 A+0.3% SKL 稀释,将溶解的蛋白浓度调至 1mg/mL。
2. 用缓冲液 A 将溶解蛋白制备液稀释 10 倍,使蛋白终浓度约为 0.1mg/mL,SKL 终浓度约为 0.03%。
3. 4°C下,溶解蛋白制备物(约 200mL),用 2000mL 缓冲液 A 透析 8h(每 4h,取 150uL 样品,用 HPLC 测定去垢剂含量),同时充分搅拌。然后换新鲜缓冲液并重复。

### 离子交换层析

7. 从透析袋中移出经透析的蛋白质溶液,4°C、8000r/min 离心 20min,除去所有聚集物。
8. 留上清(样品 J),加载于 POROS 50S 阳离子交换柱,作为后一级的分级分离。
9. 用缓冲液 A 洗涤层析用的介质,然后将其倾入带适配器接头的玻璃柱中,装成一总体积为 5mL 的层析柱。用缓冲液 A+1mol/L NaCl 洗柱。并用缓冲液 A 平衡柱子。
10. 如透析是在低盐环境下进行,则可在室温下以 4mL/min 的流速直接将蛋白样品加载于层析柱上。
11. 用缓冲液 A 洗柱 15min,然后在 60min 内,以 4mL/min 的流速,进行梯度洗脱(0-1mol/L NaCl/缓冲液 A)。检测 260nm 和 280nm 处的吸收,分部收集 4mL 组分。
12. SDS-PAGE 电泳分析各组分,并合并峰组分进行进一步分析。合并的组分可通过对缓冲液 A+50%透析,制备后储存。

