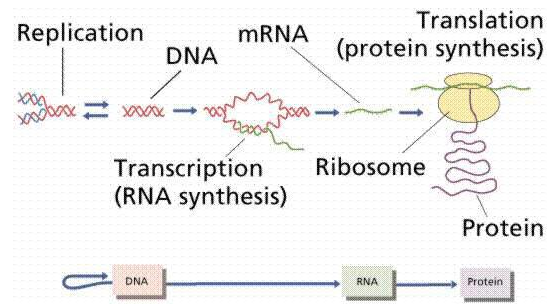


## 蛋白表达与纯化专题

蛋白表达通常是指生物体内蛋白质的合成、修饰以及调控过程。在表达系统的相关研究中，表达是指利用基因重组技术表达蛋白质的过程。本文主要关注后一个话题，着重阐述重组蛋白生产过程中的主要细胞机制。

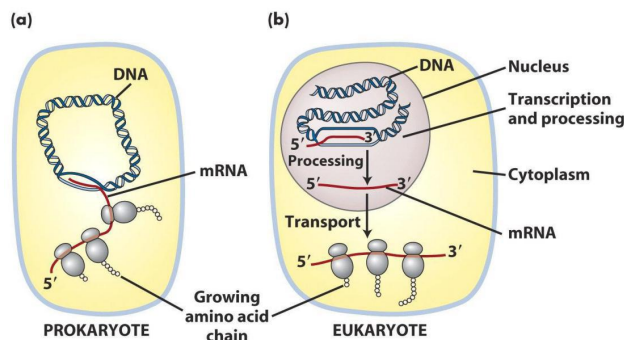
### 蛋白表达与纯化简介

蛋白在细胞内的合成和调控取决于功能的需求，蛋白质的遗传信息都储存在 DNA 的模板中，并由转录过程中产生的信使 RNA ( mRNA ) 进行解码，遗传信息通过一个 mRNA 编码，然后翻译为蛋白质。转录是指遗传信息从 DNA 传递到 mRNA 的过程，而翻译是指蛋白通过 mRNA 指定的序列进行合成的过程。



**转录和翻译的简略示意图，描述了从 DNA 碱基对序列（基因）到形成氨基酸多肽序列（蛋白质）的过程。**

在原核细胞中，转录和翻译是同时进行的。翻译甚至在成熟的 mRNA 转录产物完全合成前就已经开始了。这种转录翻译同时进行的方式被称为转录翻译的耦合 ( coupled )。而在真核细胞中，转录发生在细胞核内，翻译或蛋白质合成的场所则是在细胞质中，两者是分开且依次发生的。



真核和原核的转录翻译对比图

### 转录

原核生物和真核生物的转录的过程都包括三个步骤：起始，延伸和终止。当双链 DNA 解旋并与 RNA 聚合酶结合时转录开始。一旦转录开始，RNA 聚合酶就会从 DNA 中释放出来。转录的过程的调控依赖激活蛋白和阻遏蛋白，同时也与真核的染色质结构有关。在原核生物中，mRNA 的原始转录产物一般不需要加工修饰，翻译往往在转录

完成前就开始了。然而真核细胞中，原始转录产物则需要进一步的加工——除去内含子，mRNA 的 5'端添加“帽子”，mRNA 3'末端在多聚腺苷酸聚合酶参与下加上了一段多个腺嘌呤序列（poly A 尾）。修饰后的 mRNA 移动到细胞质中进行翻译。

## 翻译

翻译或蛋白的合成是一个复杂的过程，包括起始，延长和终止三个步骤。整个过程需要生物大分子的协同作用，如核糖体，转运 RNA（tRNA），mRNA 等；同时还需要很多的蛋白因子和小分子蛋白，如氨基酸，ATP，GTP 以及其它辅助因子。这些特殊的翻译因子存在于翻译的每一步中（详情见下表）。原核和真核的翻译过程整体上是相似的，但在部分过程中依然存在着区别。

在起始阶段，核糖体的小亚基会引发 t-RNA 扫描 mRNA，识别并结合 mRNA 5'端的起始密码子（AUG）。核糖体的大亚基和小亚基在起始密码子处链接并形成起始复合物。蛋白因子和 mRNA 参与到起始密码子的识别和起始复合物形成的过程中。延长阶段，tRNA 会结合到特定的氨基酸上（这通常被称为 tRNA 的装载作用）并在核糖体中聚合形成肽，氨基酸通过转录产物的 mRNA 序列不断添加到正在增长的肽段中。最终，新生多肽在终止密码子处停止翻译。同时，核糖体释放 mRNA，准备开始新一轮的翻译。

## 蛋白合成

原核生物与真核生物翻译过程中的主要组成部分概述

组成	原核	真核
核糖体	30S 和 50S 亚基	40S 和 60S 亚基
模板或 mRNA	转录后，mRNA 转录产物不需要进一步的修饰 mRNA 是多顺反子并包含多个起始位点	转录后，mRNA 除去非编码区（内含子），并且在 mRNA 的 5' 端和 3' 端分别加入“帽子”结构（M7 甲基鸟嘌呤）和聚腺苷酸序列。 “帽子”结构和 poly A 尾在 mRNA 转移到细胞质的过程起到很重要的作用，可以保证翻译的正确性以及 mRNA 在其他功能中的稳定性。 mRNA 通常是单顺反子。
翻译的特点	Shine-Dalgarno 序列存在于 mRNA	翻译的起始发生在两个方面：

转录物中，是核糖体亚基中的一段互补序列。

SD 序列有助于 mRNA 在起始位点与核糖体的结合准确。

新生多肽的第一位氨基酸是甲酰化的甲硫氨酸。

起始因子 三个已知启动因子：IF1，IF2，IF3

延伸因子 EF-Tu，EF-Ts，EF-G

终止或释放因子 RF1 和 RF-2

Cap-dependent 翻译：“帽结构”和帽结合蛋白负责核糖体结合 mRNA 并识别正确的密码子。mRNA 的 5'端第一个 AUG 密码子作为起始密码子，有时 Kozak 序列会出现在起始密码子附近。

Cap-independent 翻译：核糖体与 mRNA 是通过 mRNA 的“内部核糖体进入位点”（IRES）进行结合。三个以上的经磷酸化调节的起始因子，在真核翻译中，启动步骤通常是限制步骤（rate-limiting step）

EF1 ( $\alpha$ ， $\beta$ ， $\gamma$ ) 和 EF2

eRF-1

## 翻译后修饰

翻译后的多肽会采用多种加工方式来完成其蛋白结构或调节细胞活性。翻译后修饰（PTMs）是指各种添加或改变蛋白化学结构的方法，PTMs 在整体细胞生物学中起到至关重要的作用。

翻译后修饰的类型包括：

1. 通过分子伴侣的帮助，多肽折叠成一个能量处于最低的状态球状蛋白。
2. 氨基酸的修饰，如第一个甲硫氨酸残基的去除
3. 二硫键的形成或减少
4. 促进结合功能的蛋白质修饰
  - 糖基化
  - 蛋白异戊二烯化对膜的定位
  - 组蛋白乙酰化修饰 DNA 组蛋白的相互作用
5. 为了保证蛋白活性而添加的官能团：
  - 磷酸化
  - 亚硝基化
  - GTP 结合

## 蛋白表达与纯化的方法

在一般情况下，蛋白质组学研究涉及调查的一个蛋白的许多方面，如结构、功能、修饰、定位或蛋白质的相互作用等。为了研究特定蛋白的生物学调节作用，研究人员通常需要采用生产手段制造出感兴趣的功能蛋白。

对于已知大小和复杂性的蛋白，不能采用化学合成的方法。相反，活细胞及其细胞器通常被作为模板基因合成蛋白的场所。

不同的蛋白质，既可以使用简单的 DNA 综合构建，也可以利用已知的 DNA 序列在体外重组构建。因此，特殊基因的 DNA 模板无论带不带额外的亲和标签序列，均可以构造为表达模板。通过这样的重组 DNA 模板表达出来的蛋白被称为重组蛋白。

### 体内蛋白表达

传统蛋白表达纯化方式包括重组载体转染细胞，细胞培养以及转录翻译目的蛋白。通常情况下，会先裂解细胞提取蛋白，并对提取的蛋白进行纯化。原核细胞和真核细胞的体内蛋白表达系统已被广泛应用，系统的选择取决于表达蛋白的种类，功能活性和预期收益等。

原核表达系统具有易于培养，增长快速和产量高等优点。然而，多域 ( multi-domain ) 真核蛋白在细菌内的表达往往是不成功的，因为细胞无法满足翻译后修饰或分子折叠的需求。同时，许多表达的蛋白很容易形成不溶性的包涵体——如果没有合适的变性剂和复杂的复性程序很难恢复蛋白的天然构型。

哺乳动物体内表达系统虽然会产生活性蛋白，但也有着产量低，生产成本低以及细胞培养时间长等缺点。此外，在体内的表达系统不利于高通量 ( high throughput protein ) 蛋白合成或对宿主细胞有毒性的蛋白表达。

### 体外细胞表达 ( 无细胞 )

无细胞蛋白表达是采用全细胞翻译兼容提取物 ( translation-compatible extracts of whole cells ) 在体外合成蛋白质。原则上，全细胞提取物中含有所有的用于转录，翻译及翻译后修饰的大分子组件。这些组件包括 RNA 聚合酶，调控因子，转录因子，核糖体和 tRNA。

在添加辅助因子，核苷酸和特定的基因模板的情况下，几小时内就可以合成目的蛋白。

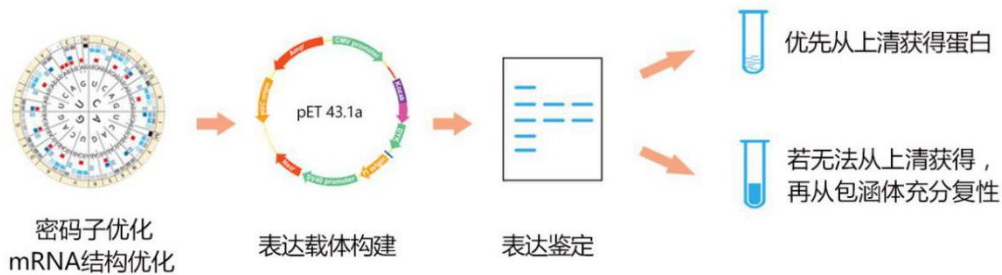
虽然这种表达方式无法应用到规模化生产中，但无细胞蛋白表达系统与传统的体内表达系统相比，仍具有很多优势：无细胞表达系统可以使重组蛋白快速合成，免除细胞培养的麻烦；无细胞系统可以使用修饰的氨基酸标签，以及表达会因蛋白酶而快速降解的蛋白。而且通过体外表达的方法，能够同时表达多种不同的蛋白。( 例如，通过从许多不同的重组 DNA 模板中进行一个小规模表达来检测蛋白突变 )

## 南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

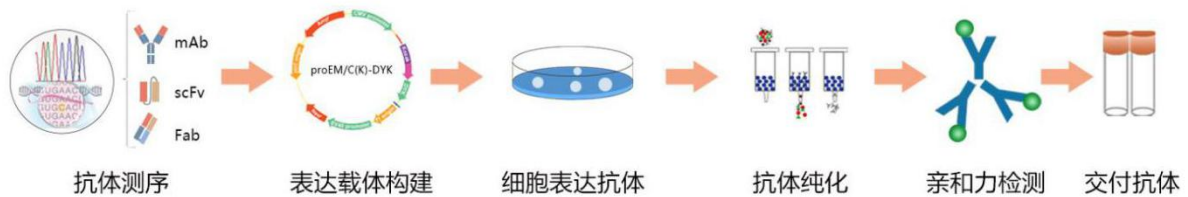
### 一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



### 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

