

蛋白质的分离纯化之不同材料的预处理方法

摘要：本文介绍了在蛋白表达纯化试验中，对不同来源的材料的预处理。主要从植物，动物和微生物三种源材料的特点和注意事项进行描述，并附有原核蛋白表达的案例。

蛋白质在分子生物学中的分类，大体上可分为天然蛋白和重组蛋白。提取天然蛋白和构建重组蛋白都需要先确定生物原材料，如植物材料主要以植物的叶，胚，果实和根茎等为主；动物通常是选用实验动物的器官和组织；而微生物则是微生物菌体本身或发酵液。从原则上讲，任何一种自然界中存在或不存在的蛋白质都可以被外源表达出来，像原核蛋白表达就是以大肠杆菌（E.coli）为宿主菌表达克隆基因，在原核表达体系中，重组蛋白的含量比杂蛋白的含量高的多，所以选择和设计合适的分离纯化方案对于重组蛋白表达纯化的下游实验就显得尤为重要。

在提取和分离蛋白时有以下几点需要注意：

1. 蛋白质提取应尽量多的提取出活性蛋白，避免各因素导致目的蛋白失活；
2. 选用不同的溶剂提取分离蛋白质（大多数蛋白溶于水，稀盐，稀酸等，少数与脂类结合的蛋白则溶于乙醇等有机溶剂）；
3. 提取蛋白一般在低温环境中操作，避免蛋白质在提取过程中降解（可加入蛋白酶抑制剂，如 PMSF、EDTA、antipain 和 leupeptin 等）；
4. 提取时缓冲液的用量通常是原材料的 1~5 倍，提取时注意均匀搅拌，这样有利于蛋白的溶解（缓冲液通常选用 PH \approx 7，0.15mol/L 磷酸盐缓冲液或 PH7.5，0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液）；
5. 蛋白质提取常用各种水溶液，一般是在偏离等电点 0.5pH 以上，此时蛋白的溶解度增加；
6. 用稀酸提取等电点在碱性范围内的蛋白质，用稀碱提取等电点在酸性范围内的蛋白，尽可能提高目的蛋白在提取液中的溶解度。

不同材料的处理

1. 植物材料的预处理

植物体内通常存在着为数众多的天然蛋白，提取时通常选用一些器官为主要原料。但植物提取蛋白时存在一些特殊问题，导致蛋白质的得率较动物和微生物的要低。

因为植物材料中除目的蛋白外还含有大量的淀粉，纤维素和果胶等杂质，所以初步的均质化处理需要在大量缓冲液中进行，初步过滤后得到低浓度蛋白，之后需要进行硫酸铵沉淀和 PEG 沉淀进行分离，分离后的蛋白可与其他蛋白一样，采用一般的蛋白纯化处理。

2. 动物材料的预处理

动物原材料组织中含有丰富的目的蛋白，根据蛋白质所处的不同位置（胞内，胞外，亚细胞器等），应选用不同的组织破碎方式。对于少量组织，可使用小型均质器，大量组织则采用捣碎机快速捣碎方法。对于软组织，可使用玻璃均质器。组织均质化后，将不同亚细胞结构内的蛋白酶释放到溶液中，使之与目的蛋白接触并降解，最后进行纯化处理。

注意：均质化时间尽可能短，减少不必要的蛋白质水解变性

在 4°C 预冷的缓冲液中进行均质化处理和后期分离操作，有助于降低蛋白质水解

在缓冲液中添加蛋白酶抑制剂控制蛋白质水解

3. 微生物材料的预处理

微生物可产生多种天然蛋白和重组蛋白，提取天然蛋白，首先要对大量菌株筛选获得高产菌株，再进行诱变育种分离产量更高的正突变菌株，最后通过基因工程技术提高内源微生物蛋白产量。而重组蛋白的提取相对来说就简单地多，微生物可以通过发酵的方式，短时间内大量培养，从而分离出大量可纯化的目的蛋白。与植物和动物处理方法相比较，微生物蛋白通常比来源于植物和动物的相同蛋白质要更加稳定，也更易于遗传学操作。只要筛选出正确的培养条件，就可以获得大量的特定蛋白质菌体。

4. 细菌的裂解

细胞的破碎裂解是指用物理、化学、酶或机械等方法破坏细胞壁或细胞膜，从而将胞内物质（目的蛋白）释放到周围环境的过程。针对不同用途和类型的细胞壁发展了多种方法，目前常用方法大体上可分为机械法和非机械法两类，常用的机械破碎法有：高温珠磨法；高压匀浆；超声破碎法。而非机械法包括渗透压冲击法；冻融破碎法；酶溶法；化学破碎法等。下面介绍在实验室研究中应用较为广泛的酶溶法和超声破碎法。

酶溶法

常用的溶解酶有溶菌酶； β -1, 3-葡聚糖酶； β -1, 6-葡聚糖酶；蛋白酶；壳多糖酶；糖苷酶等。溶菌酶主要作用于细菌类，而其他几种酶对酵母作用较为显著。

主要步骤为：

1. 4 °C , 5000rpm 离心 15 min , 收集诱导表达的细菌培养液 (100 mL) 。弃上清 , 每克湿菌内加 3 mL 裂解缓冲液 , 悬浮沉淀 ;
2. 沉淀称量 , 每克菌内加 8mL PMSF 及 80mL 溶菌酶 , 搅拌 20 min ; 边搅拌边每克菌加 4 mg 脱氧胆酸 (低温中进行) ;
3. 37 °C , 玻棒搅拌 , 至溶液粘稠时每克菌内加 20mL DNase I。室温放置至溶液不再粘稠。

超声破碎法

声频为 15-20 kHz 的超声波在高强度声能输入下可以对细胞进行破碎 , 在处理少量样品时具有操作简便 , 重复性好 , 节省时间 , 液体量损失较少等优势 , 同时还可对染色体 DNA 进行剪切 , 降低液体的粘稠度。

主要步骤为 :

1. 收集 1 L 诱导表达的工程菌 , 40 °C , 5000rpm 离心 , 15 min ; 弃上清 , 每克湿菌加 3 mL TE 缓冲液 ;
2. 按超声处理仪厂家提供的功能参数进行破菌 ; 10000g 离心 , 15min , 分别收集上清液和沉淀 ;
3. 分别取少量上清和沉淀 , 加入凝胶电泳加样缓冲液 , 进行 SDS -PAGE 检测。

注意 : 超声破碎与声频、声能、处理时间、细胞浓度、菌种类型等因素有关 , 应根据具体情况掌握 ; 超声波破菌前 , 标本经 3 -4 次冻溶后更容易破碎。

案例——从大肠杆菌中提取诱导表达的 His6-X

简介

大肠杆菌表达系统操作简便 , 能够获得优化的表达质粒。而组氨酸标签 (His) 6 是常用的重组蛋白纯化标签。

材料

感受态细胞、表达载体、LB 培养基、氨苄青霉素、IPTG、蛋白酶抑制剂、Ni-NTA 亲和层析柱、超声波破碎仪、高速冷冻离心机、紫外分光光度计、结合缓冲液 (50mmol/L Tris , PH7.9 , 500mmol/L NaCl , 5mmol/L 咪唑) 、洗脱缓冲液 (50mmol/L Tris , PH7.9 , 500mmol/L NaCl , 500mmol/L 咪唑)

方法

1. 采用 RT-PCR 扩增得到目的基因 X，构建到表达载体上；
2. 用构建质粒表达转化菌株，LB 平板 37°C 培养过夜；
3. LB 平板上挑取一单菌接入 5mL LB 培养基（100ug/mL Amp），37°C 培养 3~5h；
4. 将 5mL 菌液接入 1L LB 液体培养基中（100ug/mL Amp），37°C 培养至 OD60≈0.6，加入 0.3mmol/L 的 IPTG，16°C 诱导 16h；
5. 将培养好的菌液放入离心机中，5000r/min 离心 10min，弃去上清，收集菌体，离心后的菌体沉淀悬浮于 25mL 结合缓冲液中；
6. 将悬浮菌液装在 50mL 玻璃烧杯中，加入适量蛋白抑制剂（10uL 的 10mg/mL antipain），冰浴放置；
7. 超声破碎，每个循环 26 次，超声 6s，间隔 5s，根据破碎效果共 2~4 个循环，破碎后的菌体 4°C 18000r/min 离心 30min，上清液保持在 4°C；
8. Ni 柱先用结合缓冲液平衡，然后上样，结合 30min 后，每 5~10min 搅拌一次，静置流干；
9. 用 2~3 倍柱体积结合缓冲液清洗非特异性结合蛋白，再加入 15mL 洗脱缓冲液洗脱，可分两次加入以增加洗脱效率；
10. SDS-PAGE 检测初步纯化效果，进行下一步纯化步骤。

问题分析及解决方案

1. 目的蛋白得不到可溶性表达或表达量很低

原核蛋白表达过程中，选择构建合适的表达载体需要考虑三个因素：表达载体、表达菌株、表达诱导条件。针对这三个方面对表达实验进行调整，优化表达条件；考虑更换不同的表达菌株（BL21、Rosetta、Origami PLYS 等）；表达载体可换成带有其他有助于可溶性蛋白表达的标签载体（GST，MBP）。

2. 表达出来的蛋白易降解

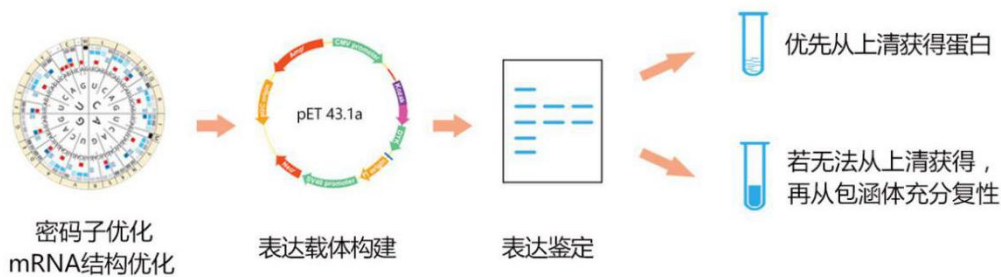
首先要保证原核蛋白表达的操作过程处于低温环境；操作过程中适当的补加一些蛋白酶抑制剂，尽量缩短提取时间；洗脱的目的蛋白溶液于 4°C 短暂保存，不易时间过长；注意超声波的处理条件，判断是否由超声波处理过于剧烈而造成的降解。

南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

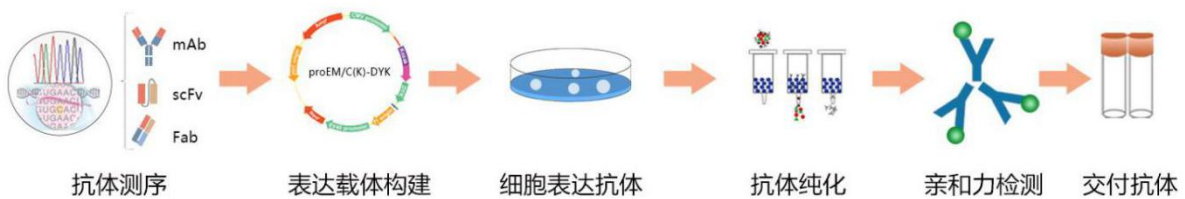
一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



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

