

重组蛋白分离纯化的方法策略及案例介绍

分离纯化处于重组蛋白表达的下游处理 (downstream processing) 阶段，且与上游过程紧密相联，如是否带有亲和标签，是否进行分泌表达等。所以在对目的蛋白表达纯化时，要统一考虑和整体设计，并充分考虑上游对下游的影响。同时，不同的表达系统和培养方法也影响下游的处理过程：目的蛋白表达是否形成包涵体，目的蛋白表达定位 (胞内、细胞膜内、周质空间和细胞外)

表达策略	优点	缺点
	增强正确二硫键的形成	
	降低蛋白酶对表达蛋白的降解	表达水平低
分泌表达至细胞外	可获得确定的 N 末端	多数蛋白不能进行分泌表达
	显著减少杂蛋白水平，简化纯化	表达蛋白需要浓缩
	不需要细胞破碎	
	增强二硫键正确形成	一些蛋白不能分泌进入周质空间
细胞周质空间表达	可获得确定 N 末端	没有大规模选择性地释放周质空间蛋白的技术
	显著减少杂蛋白水平，简化纯化	周质蛋白酶可引起重组蛋白的酶解
	包涵体易于分离	需要体外的折叠和溶解，得率较低
细胞内包涵体表达	保护蛋白质不被降解	具有不确定 N 末端
	蛋白质不具有活性，对宿主细胞生长没有大影响	高水平的表达难以得到
细胞内可溶性蛋白	通常可获得高表达水平	需要复杂的纯化
表达	不需要体外溶解和折叠	可发生蛋白质酶解
	一般具有正确的结构和功能	具有不确定 N 末端

由上表可知选择将所表达的蛋白分泌到细胞外或周质空间可避免破碎细胞的步骤，而且细胞外和周质空间内的蛋白种类较少，目的蛋白易纯化；而在细胞质内表达重组蛋白时，重组蛋白通常是可溶性表达，但也易形成包涵体。可溶性蛋白往往需要复杂的纯化步骤，而包涵体易于分离且纯度较高，但回收具有生物活性的蛋白质却变得相当困难，通常需要对聚集的蛋白进行变，复性，而通常情况下活性蛋白的得率比较低。德泰生物凭借多年的蛋白表达服务操作经验和相关的技术，可以提供可溶性重组蛋白保证型服务和更高纯度的上清蛋白。

分离纯化原则总结：

1. 应尽可能利用蛋白质不同物理特性选择所用的分离纯化技术，而不是利用相同技术多次纯化；
2. 不同的蛋白在性质上有很大区别，每一步纯化步骤都应当充分利用目的蛋白和杂质成分物理性质差异；
3. 在纯化早期阶段要尽量减少处理体积，方便后续纯化；
4. 在纯化后期阶段，再使用造价高的纯化方法，有利于纯化材料的重复使用，减少再生复杂性。

色谱法分离纯化蛋白质

色谱法又称层析法，是利用不同物理化性质的差异而建立起来的技术。所有的色谱系统都由两个相组成：固定相（固体物质或固定于固体物质上的成分）和流动相（水和其他溶剂）。当待分离的混合物随流动相通过固定相时，各组分与两相发生相互作用（吸附，溶解，结合）并因作用力的不同导致流出时间上的差异，分部收集流出液，可以得到样品中所含的各单一组分，从而达到分离各组分的目的。

色谱层析分离纯化蛋白质有多种方法，包括凝胶过滤色谱，离子交换色谱，亲和色谱，疏水色谱高效液相色谱等。其中亲和色谱在重组蛋白纯化中的应用中最为广泛。

亲和色谱

原理

亲和色谱是利用待分离物质和它的特异性配体间具有的特异性亲和力，从而达到分离的目的。即将一对能可逆结合和解离生物分子的一方作为配基，与具有大孔径、亲水性的固相载体相偶联、制成专一的亲和吸附剂并填充色谱柱，使得样品混物流经色谱柱时，与亲和配基能结合的物质就被选择性地吸附下来，而其他的蛋白质及杂质不被吸附，从色谱柱中流出，使用适当的缓冲液使被分离物质与配基解吸附，即可获得纯化的目的产物。

亲和色谱具有高选择性，高分辨率和高容量的特点，并且亲和色谱纯化过程简单，迅速，且分离效率高。并且可用于纯化生物大分子、稀溶液的浓缩、不稳定蛋白的贮藏、从纯化分子中除去残余污染物等。但其必须针对某一分离对象，制备专一的配基和寻求稳定色谱的条件，且成本较高。

实验案例 (从 E.coli 中提取诱导表达的 GST 标签融合蛋白)

简介

谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 亲和标签是纯化重组蛋白的常用方法, 该方法以 GST 能够偶联在介质上的谷胱甘肽配体结合为基础。同时, 带有 GST 的蛋白与配体结合是可逆的, 能够在温和, 非变性的条件下通过加入还原型谷胱甘肽被洗脱下来。

材料

BL21 感受态细胞、PGEX 表达载体、LB 培养基、Amp(氨苄青霉素)、IPTG、蛋白酶抑制剂、缓冲液 1(100mmol/L Tris , PH 8.5 , 500mmol/L NaCl)、缓冲液 2 (100mmol/L NaAc , PH 4.5 , 500mmol/L NaCl)、PBS 缓冲液(100mmol/L NaCl , 2.7mmol/L KCl , 10mmol/L Na₂HPO₄ , 1.8mmol/L KH₂PO₄)、洗脱缓冲液(50mmol/L Tris , PH 8.0 , 10mmol/L GSH)、微量紫外分光光度计、超声波破碎仪、高速冷冻离心机、GST 柱

方法

一、载体构建和细菌培养

5. 采用 RT-PCR 扩增得到目的基因, 构建到表达载体 (PGEX-4T-1) 上 ;
6. 用构建质粒转化表达菌 BL21 , LB 平板 37°C ;
7. LB 平板上挑取单一菌落接入 5mL LB 培养基 (100ug/mL Amp) 中 , 37°C 培养 3~5h ;
8. 将 5mL 菌液接入 1L LB(100ug/mL Amp) 液体培养基中 , 37°C 培养至 OD₆₀₀≈0.6 加入 0.3mmol/L 的 IPTG ;
9. 16°C 诱导 16h ;
10. 将培养好的菌液于 5000r/min 离心 10min , 弃去上清液 , 收集菌体 , 离心后菌体沉淀悬浮于 25mL Binding buffer 中。

二、细胞破碎和蛋白分离

1. 往悬浮好的菌液中加入适量蛋白抑制剂(10uL 的 10mg/mL antipain , 10uL 的 10mg/mL leupeptin 和 1mL 的 1mol/L PMSF) , 冰浴放置 ;
2. 超声破碎, 每个循环 26 次, 超声 6s , 间隔 5s , 视破碎效果共 2~4 个循环, 破碎后的菌体 4°C 1800r/min
3. 离心 30min , 上清保持在 4°C ;
4. GST 柱先用 PBS 缓冲液平衡, 上样结合 30~60min , 每 5~10min 搅拌一次, 流干 ;

5. 用 2~3 倍体积 PBS 缓冲液平衡清洗非特异性蛋白，流干，加入 15mL 洗脱缓冲液洗脱；
6. 由于残存少量蛋白酶，洗脱出来的目的蛋白溶液可于 4°C 保存几小时；
7. SDS-PAGE 检测初步纯化效果，进行下一步纯化步骤。

三、蛋白检测和 GST 柱的恢复

1. 用 3 倍柱体积的 6mol/L 盐酸胍处理柱子 10min；
2. 用 3 倍柱体积的水洗柱 2~3 次；
3. 用 3 倍柱体积的缓冲液 1 处理柱子 10min；
4. 用 3 倍柱体积的缓冲液 2 处理柱子 10min；
5. 再次重复 3, 4 步骤两次；
6. 用 3 倍柱体积的水洗柱 2~3 次；
7. 用 3 倍柱体积的 PBS 缓冲液洗柱 2 次；
8. 往柱内加 3 倍体积 PBS 待用。

四、问题分析及解决方案

GST 标签蛋白不结合柱子或结合能力非常弱的原因及解决办法

原因

1. 过分的机械裂解使标签蛋白变性，阻止结合；
2. GST 标签蛋白在样品中有聚集，导致沉淀；
3. 标签蛋白浓度过低；
4. 标签蛋白可能改变了 GST 构相；
5. 平衡时间过短。

解决方法

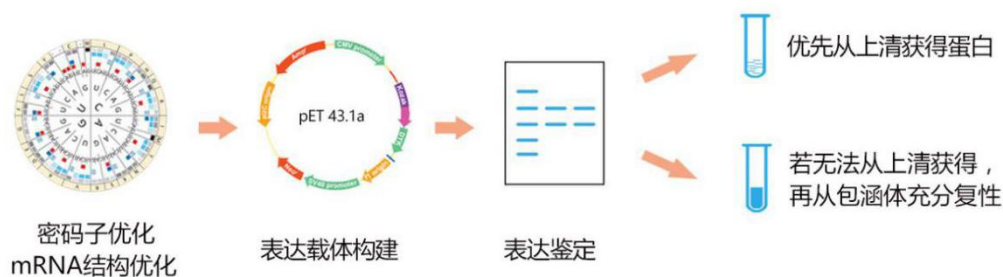
1. 裂解过程中，采用温和的裂解条件；
2. 在细胞裂解前的缓冲液中加 DTT；
3. 浓缩样品，结合能力依赖浓度；
4. 可以通过降低结合的温度来改善结果；
5. 确认至少用 5 倍柱体积的 PH 6.5~8.0 的缓冲液平衡过。

南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

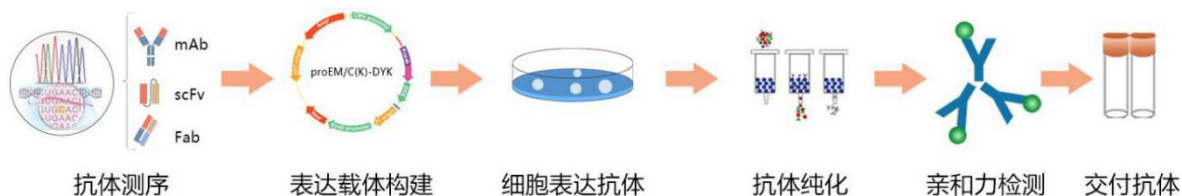
一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



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

