

原核表达系统蛋白表达问题解析

一、外源 DNA 片段成功插到载体里面（PCR 鉴定），但无法表达蛋白

一般判断目的基因是否表达，首先要进行 SDS-PAGE 检测。跑胶的时候一定要设对照：Marker，标准品阳性对照，以及空白载体（诱导）和重组载体（不诱导）2 个阴性对照，再加上诱导不同时间的表达结果。跑 SDS-PAGE 的话可以用考马斯亮兰染，它灵敏度在 100ng 左右；但是不能跟着做 western blot 了。银染的灵敏度在 0.1 ~ 1 ng；或是 Sypro Red，灵敏度高还可以继续做 Western blot。

在做过 Western Blot 仍没有检测到表达带，那么就要先判断载体的多克隆位点和片断插入的序列，是否有因为酶切连接而意外引入了转录终止信号。其次要对测序结果进行确定，确定插入的每个碱基都是正确的，没有意外终止的情况。最后，也需要注意基因中是否有稀有密码子，可更换表达菌株。

每种菌株都有自己独特的设计，或者是蛋白酶缺陷，或者是重组酶缺陷，改造的目的都是为了让质粒在细菌中存在更稳定，表达的产物不易被降解。不同的载体要配合一定的菌株使用，像 pET 系列就一定需要有 T7 RNA 聚合酶片段整合在细菌中的菌株才可用于表达。采用不同调控机制会使用不同的表达菌株，所以换菌株一定要仔细看过载体的调控方式再换。例如，使用 BL21（DE3）菌株表达不成功可以尝试用 Rosetta 系列菌株表达，它能够由一种氯霉素抗性的、与 pET 相容的质粒提供 AUA，AGG，AGA，CUA，CCC 和 GGA 的 tRNA。所以这类菌株能够明显改善大肠杆菌中由于稀有密码子造成的表达限制。有时不明原因的表达蛋白截短（比预期的分子量要小很多）也可能是由于稀有密码子造成的。

没有发现原则性错误之后，可以从表达条件入手，梯度条件改变表达温度、IPTG 浓度，低温、较长时间的表达有利于蛋白稳定、融合表达；低浓度的 IPTG 可以减少化学物质对细胞的损伤。而且培养基中的葡萄糖可能会抑制表达。导致表达的蛋白与预期的不同。如果尝试改变条件后依然没有表达，可以试试换不同的培养基（如 LB、TB、M9 等）。

如果以上方法均无法表达出目的蛋白，可更换载体-表达系统。在换过不同载体，不同菌株之后仍是表达不出来的话，可以尝试其它的表达系统，因为有些蛋白是在大肠杆菌表达系统中无法表达。

二、蛋白表达出来了，但是跑 SDS-PAGE 时大小不符？

SDS-PAGE 时蛋白的净电荷会影响迁移率。带电量高的蛋白会结合较少的 SDS，阻碍蛋白的泳动。富含脯氨酸的蛋白会在 SDS-PAGE 胶中移动得特别慢。如果蛋白的等电点在 5~9 之间，并且组成的氨基酸组分没有明显的偏好，那么目的蛋白迁移率与预期相差较远就很有可能不是由于凝胶电泳造成的，可能是稀有密码子造成表达产物的截短。利用 C 端或者 N 端的标签进行 Western Blot，看是否由于蛋白被蛋白酶降解而导致多条目的条带或者比预期小很多的条带出现。

三、重组表达的蛋白为不可溶包涵体

大多数在大肠杆菌中表达的外源蛋白都是以包涵体形式存在。一般情况下，形成包涵体表达产率都很高，并且容易分离，得到比较纯的包含体。包涵体致密的结构有助于防止蛋白酶对它的降解作用，如果毒性较强的蛋白形成包涵体也就不会对细胞产生太大的损伤。如果表达蛋白的目的是为了作为抗原制备抗体，那么可以用 PBS 将包涵体悬浮，使用佐剂将溶液乳化后注射进入动物体内进行免疫。

包含体的形成据分析原因之一在于表达量过高，表达产物来不及折叠为活性形式——多数以高表达见长的表达系统都会得到包含体产物。如果融合表达含有标签，常用的做法是将包涵体用尿素溶解后在变性的情况下进行纯化，然后复性。

四、如何获取可溶性蛋白

如果需要获得具有一定活性的表达蛋白，那么最好让蛋白可溶形式表达，避免包涵体形成。避免包涵体的方法很多，比如：选用表达量不高的表达系统，选择有助于可溶性表达的融合表达系统比如 pThio，pMal 等等，对于 T7 系统来说降低或者减少诱导条件（例如降低 ITPG 浓度减少 T7 聚合酶）从而降低表达速度，使用基本培养基等也有助于可溶性表达。另外一个容易忽视的问题是 大肠杆菌内还原性过高会导致二硫键不能正确形成，同样容易导致表达产物不溶，更换菌株例如 Novagen 的 Origami 系列也有助于解决这个问题。还有一种方法是当蛋白挂在柱子上的时候，在还原和氧化的谷胱甘肽存在的条件下用浓度从 6M 到 0M 的盐酸胍过柱，促使蛋白的折叠。在蛋白重新折叠后用咪唑洗脱。德泰的上清蛋白表达服务通过条件矩阵正交优化的方法，使重组蛋白表达在上清液中，即获得具有相当活性的表达蛋白

五、切除标签时引入的蛋白酶是否一定要切除？

很多时候我们要用蛋白酶除去加入的标签，在蛋白酶切除标签后是否一定要去除呢？有人认为蛋白酶与目的蛋白加入的比例是 1:500 甚至更低，蛋白酶是不会影响到下一步操作的，在一些粗放的生化实验不用去处蛋白酶。严谨的后继实验需要将蛋白酶除去。很多公司已经开发出带有标签的蛋白酶，使得仅通过亲和柱就可以方便的去蛋白酶和融合标签。Tag-Free 技术与传统的标签切除技术不同，不存在蛋白酶引入导致杂蛋白影响的情况，具体对比如下：

对蛋白影响	标签蛋白	无标签蛋白
对蛋白结构功能影响	较长的标签有可能限制重组蛋白折叠，影响蛋白的结构和生物学功能	无标签蛋白氨基酸序列与天然蛋白氨基酸序列基本相同，更接近天然蛋白的结构
免疫原性	较易产生非特异性抗体，影响抗体制备	保持蛋白抗原的天然结构
蛋白结晶与 X 射线结构解析	额外的标签氨基酸可能造成晶体结构改变，影响功能结构分析	无额外的标签氨基酸，更接近天然蛋白的构象，更易结晶
FDA 药检审批	通常因含有额外引入的氨基酸，与天然蛋白序列存在差异，不易通过审核	与天然蛋白序列一致，易通过审核

更多优质服务推荐

1

SingleB® mAb Discovery Service

SingleB®单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务,利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台,实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象,从动物免疫到获得单抗,快至29天,比传统杂交瘤技术至少节省120天。

平台优势



支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫



记忆B细胞 & 浆细胞双筛选,保证B细胞多样性



单细胞扩增阳性率高,无需刺激培养,减少多样性损失



重轻链天然配对,亲和力更优



高通量,周期短,单抗发现快至29天



ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种



小鼠



兔



羊驼



人源化小鼠



猪



犬

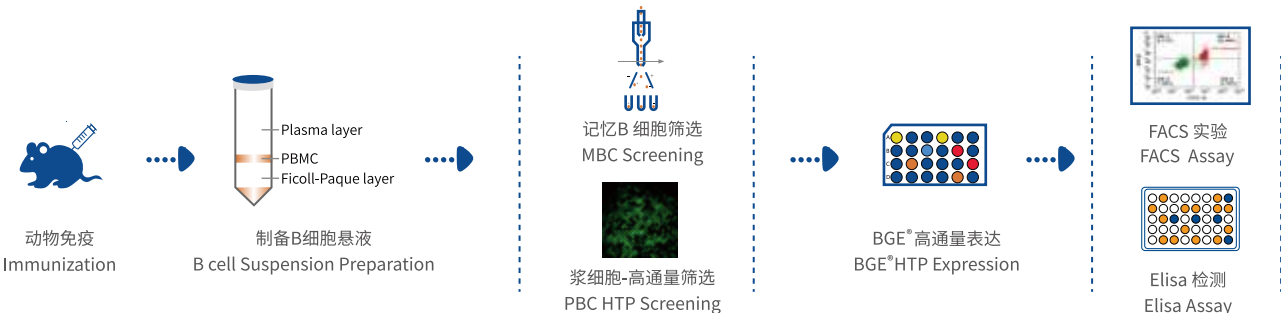


绵羊



人

服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

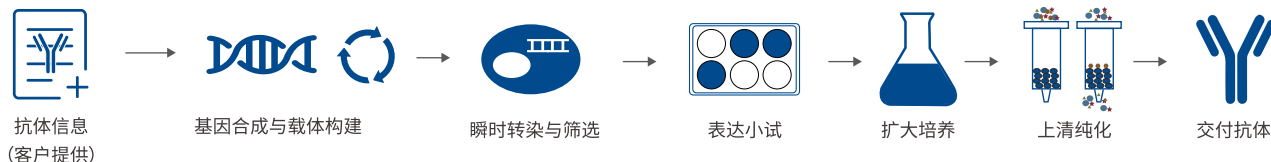
重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、 $(\text{Fab}')_2$ 、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势



服务流程

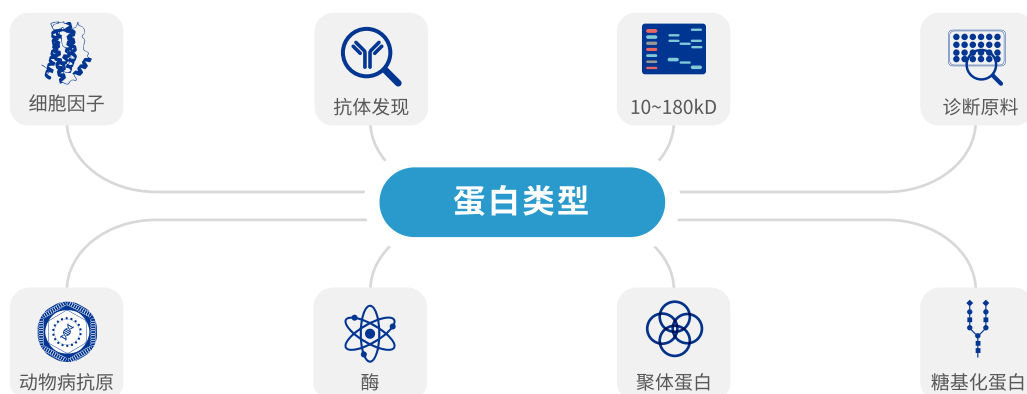


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4 Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术,能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

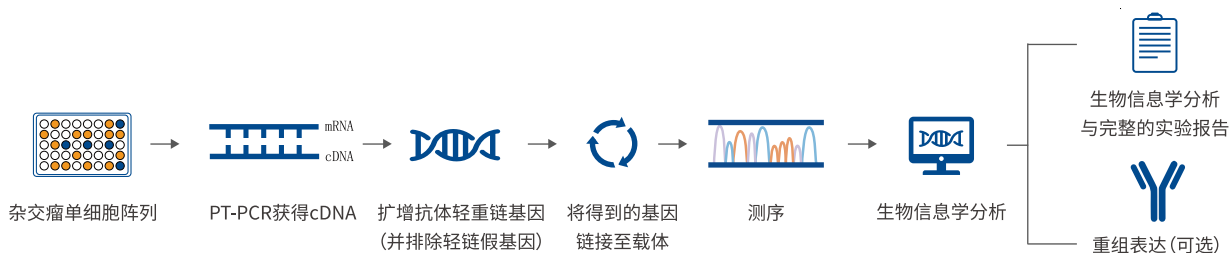
应用场景

- 抗体序列保护:获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份:杂交瘤存在退化转阴风险,抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造:获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验:测序5天,表达5天,全程高通量
- 细胞需求少:只需1~5个细胞,可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确:采用Failsafe®假基因排除技术,可排除k轻链假基因
- 测序范围广:可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务:德泰生物拥有丰富经验,可提供表达验证服务

服务流程

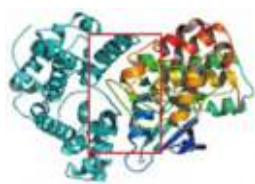


5 Biomolecular Interaction Analysis Service

分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down, 免疫共沉淀, 酵母双杂交等相比, 具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

检测范围



蛋白和蛋白



蛋白和小分子



蛋白和抗体



蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。



Antibody Humanization Service

抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势



重链和轻链同时参与优化



改造后的抗体人源化程度>90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

- 1 Antibody sequence confirmation
- 2 Human germline acceptor selection
- 3 CDR grafting
- 4 Back mutation
- 5 Mutation energy ranking
- 6 Antibody expression
- 7 Affinity ranking



Stable Cell Line Development Service

生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

服务流程



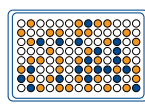
基因合成&质粒抽提



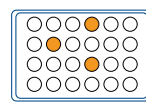
稳定转染



On-chip筛选



压力筛选



扩大培养



交付单克隆细胞株

服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株
较传统方法快近100天



百k级筛选通量

一次筛选640k细胞
优选高表达细胞株



可视化筛选结果

先进DeepLight®平台
高表达细胞株实时成像



稳定高产

可稳定转代50代
重组单抗可达5 g/L