蛋白纯化标签选择

体外重组蛋白表达技术已经渗透到生物学的各个领域。目前，体外重组蛋白表达系统主要有四类：原核表达系统、哺乳动物细胞表达、酵母表达系统及昆虫细胞表达。表达的一般实验包括载体构建-表达鉴定-蛋白纯化三大步骤。在构建载体阶段，除了一些必要的表达元件，还需要考虑的密码子优化和标签的选择。选择合适的标签不但有利于蛋白的纯化，促进蛋白的可溶性，同时也不能影响蛋白的结构功能和下游应用。本文详细介绍了几种蛋白纯化标签，帮助我们更好的设计实验。

蛋白纯化标签比较

融合标签	大小（KD）	功能	是否切除
HIS	0.84	有利纯化，能纯化可溶性/包涵体蛋白	标签小，对蛋白无影响
GST	26	增强蛋白可溶性，仅能纯化可溶性蛋白，屏蔽毒性蛋白	
MBP	44.4	增强蛋白可溶性，屏蔽毒性蛋白	标签较大，影响较大
NusA	55	增强蛋白可溶性，屏蔽毒性蛋白	
SUMO	11.2	增强可溶性，屏蔽毒性蛋白	

表 1：各个标签性能对比表

HIS-Tag（组氨酸标签）

HIS-Tag 蛋白纯化的首选标签

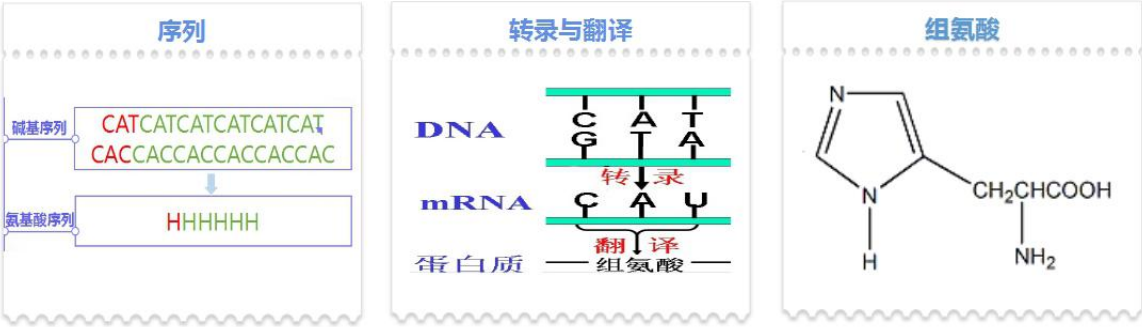
HIS-Tag 本身的特性对目的蛋白没有影响，不会形成二聚体；

分子量较小，只有 0.84KD，对蛋白的下游应用不会产生影响；

免疫原性低，可将纯化的蛋白直接注射动物进行免疫并制备抗体；

HIS-Tag 与细菌的转录翻译机制兼容，有利于蛋白表达；

可与其他标签构建双标签表达，可用于多种蛋白表达系统，纯化条件温和对蛋白影响较小。



HIS-Tag 由 6-10 个组氨酸残基组成，分子量不到 0.84KD，，通常插入在目的蛋白的 C 末端或 N 末端。HIS-Tag 是目前原核表达最常用的标签，蛋白纯化完之后可以不需切除此标签，也不会对蛋白产生功能影响。同时，蛋白纯化步骤简便，纯化条件温和，对蛋白也不会产生太大影响。

GST-Tag（谷胱甘肽巯基转移酶标签）

GST-Tag 相对分子质量较大，约为 26KD，插入在目的蛋白的 C 末端或 N 末端，大肠杆菌中常用在 N 端。GST(谷胱甘肽巯基转移酶）蛋白本身是一个在解毒过程中起到重要作用的转移酶。一般选择 GST 标签的目的有两个，一是提高蛋白表达的可溶性，二是提高蛋白的表达量。蛋白表达纯化结束后需根据不同的蛋白应用而确定是否切除标签，标签较大，切除与否需根据下游应用考虑。如果要去除 GST 融合部分，可用位点特异性蛋白酶切除。检测方法可用 GST 抗体或表达的目的蛋白特异性抗体检测。

GST 的序列：

碱基序列

```
1    ATGTCCCCTA TACTAGGTTA TTGGAAAATT AAGGGCCTTG TGCAACCCAC TCGACTTCTT
61   TTGGAATATC TTGAAGAAAA ATATGAAGAG CATTTGTATG AGCGCGATGA AGGTGATAAA
121  TGGCGAAACA AAAAGTTTGA ATTGGGTTTG GAGTTTCCCA ATCTTCCTTA TTATATTGAT
181  GGTGATGTTA AATTAACACA GTCTATGGCC ATCATACGTT ATATAGCTGA CAAGCACAAC
241  ATGTTGGGTG GTTGTCCAAA AGAGCGTGCA GAGATTTCAA TGCTTGAAGG AGCGGTTTTG
301  GATATTAGAT ACGGTGTTTC GAGAATTGCA TATAGTAAAG ACTTTGAAAC TCTCAAAGTT
361  GATTTTCTTA GCAAGCTACC TGAAATGCTG AAAATGTTCG AAGATCGTTT ATGTCATAAA
421  ACATATTTAA ATGGTGATCA TGTAACCCAT CCTGACTTCA TGTTGTATGA CGCTCTTGAT
481  GTTGTTTTAT ACATGGACCC AATGTGCCTG GATGCGTTCC CAAAATTAGT TTGTTTTAAA
541  AAACGTATTG AAGCTATCCC ACAAATTGAT AAGTACTTGA AATCCAGCAA GTATATAGCA
601  TGGCCTTTGC AGGGCTGGCA AGCCACGTTT GGTGGTGGCG ACCATCCTCC AAAATCGGAT
661  CTGGTTCCGC GTGGATCCCC GGAATTCCCG GGTCGACTCG AGCGGCCGCA TCGTGACTGA
```

氨基酸序列

```
1    MSPILGYWKI KGLVQPTRLL LEYLEEKYEE HLYERDEGDK WRNKKFELGL EFPNLPYYID
61   GDVKLTQSMA IIRYIADKHN MLGGCPKERA EISMLEGAVL DIRYGVSRIA YSKDFETLKV
121  DFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFK
181  KRIEAIPQID KYLKSSKYIA WPLQGWQATF GGGDHPPK
```

GST-Tag 的优缺点

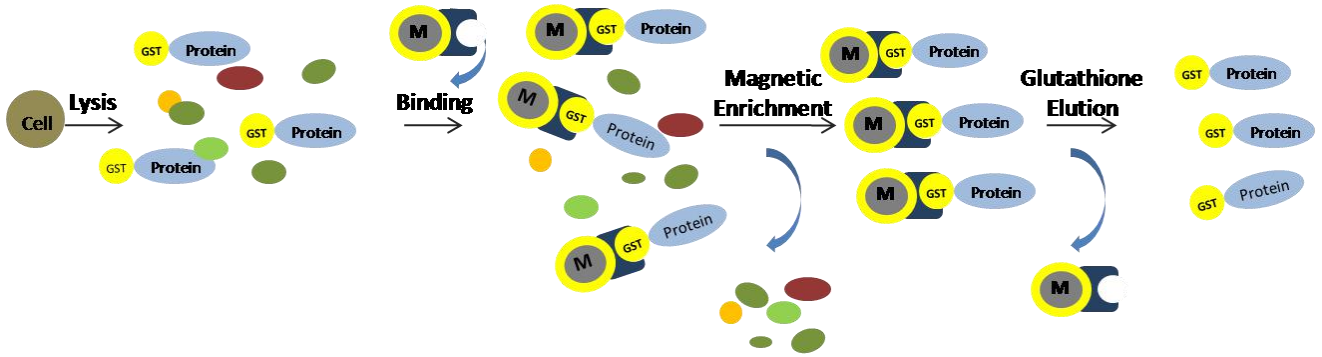
- 增加外源蛋白的可溶性；
- 可在不同的宿主中表达，适用范围广；
- 可用不同的蛋白酶可以方便去除；
- 很好保留了蛋白的抗原性和生物活性，提高外原蛋白的稳定性；
- 高特异性，纯化方便且温和；
- 分子量较大，可能会影响蛋白质的功能和下游实验；
- 如果蛋白不可溶，很难用变性的方法纯化。

GST 亲和纯化原理

GST 亲和层析是利用 GST 融合蛋白与固定的谷胱甘肽(GSH)通过硫键共价亲和，通过 GSH 交换洗脱的原理来进行纯化 。该纯化柱中，凝胶手臂上通过硫键结合一个谷胱甘肽。然后利用谷胱甘肽与谷胱甘肽巯基转移酶（即 GST-tag（26 KDa））之间酶和底物的特异性作用力，使得带 GST 标签的融合蛋白能够与凝胶上的手臂谷胱甘肽结合，从而将带标签的蛋白与其他蛋白分离开。谷胱甘肽通常有氧化型 GSSG 和还原型 GSH，当我们使用 GSH 洗脱时，GSH 会与凝胶上的谷胱甘肽竞争结合融合蛋白，从而将目标蛋白洗脱。

GST 标签蛋白可直接从细菌裂解液中利用含有还原型谷胱甘肽琼脂糖凝胶（Glutathione sepharose）亲和树脂进行纯化。GST 标签蛋白可在温和、非变性条件下洗脱，因此保留了蛋白的抗原性和生物活性。GST 在变性条件下会失去对谷胱甘肽树脂的结合能力，因此不能在纯化缓冲液中加入强变性剂如：盐酸胍或尿素等。如果蛋白表达在包涵体中，可复性后再纯化。此外要去除 GST 标签，可用位点特异性蛋白酶切除。

GST 蛋白纯化流程图：



MBP-Tag（麦芽糖结合蛋白标签）

MBP（麦芽糖结合蛋白 maltose binding protein）， 残基数 346，分子量 42.5KDa，由大肠杆菌 K12 的 malE 基因编码，构建时刻放在 N 端，用来提高可溶性（尤其是真核蛋白）。MBP 的折叠需要 DnaK-DnaJ-GrpE 和 GroEL-GeoES 两个分子伴侣系统的帮助，这可以使这些分子伴侣聚集到目的蛋白的附近帮助其正确折叠。另外，以标签蛋白形式存在的麦芽糖结合蛋白可以减少目的蛋白的降解，提高表达产物的水溶性，也为以后对目的蛋白的纯化提供了基础。麦芽糖结合蛋白能够被多糖树脂吸附，因此在过柱时，能够使融合蛋白与其它蛋白成份分离。

MBP 标签的优缺点

- 简单亲和纯化即可实现；
- 增加蛋白表达量和蛋白稳定性；
- 促进蛋白的可溶性和正确折叠；
- 标签较大，对蛋白的结构/功能会有一定影响。

NusA-Tag（转录终止/抗终止蛋白标签）

NusA 是大肠杆菌自身的一种蛋白 ,即转录抗终止因子 ,残基数,495 ,分子量:54.87KDa ,由 1999 年 Davia 将 NusA 从 4000 种大肠杆菌蛋白库中筛得。NusA 不具有独立的纯化标签功能，所以要与其它标签(如 His 标签)联用。利用原核表达时，NusA 标签可以明显的提高蛋白的可溶性，例如含有 NusA 标签的人白介素-3 融合蛋白(NusA/hIL-3)在 37℃条件下诱导表达几乎全部可溶(97%)，而当其单独表达或融合 GST 标签表达时都是包涵体形式。另外 NusA 标签还可以提高不溶性靶蛋白如牛生长激素（bGH)、人干扰素-γ (hIFN-γ)的可溶性。来自草木犀根瘤菌(Rizobiummeliloti)的酪氨酸激酶因为分子量大(超过 54kDa)并且基因含有大量稀有密码子，自身在大肠杆菌中无法过量表达，但是与 NusA 融合后却可以高效表达。

NusA 氨基酸序列：

NusA Protein Length=495 MW=54897.3 Predicted pI=4.24

```
1   mnkeilavve avsnekalpr ekifealesa latatkkkye qeidvrveid rksgdfdtfr
61  rwlvveevtq ptreitleaa rfedesmnvg dyvedqiesv tfdrittqta kqvivqkvre
121 aeramvvdqf rehegeiitg vvkkvnrdni tldlgnnaea vilredmlpr enfrpgdrir
181 gvlyavrpea rgaqlfvtrs kpemlielfr ievpeigeev leikaaardp gsrakiavkt
241 ndkridpvga cvgmrgarvq avstelgger idivlwddnp aqfvinamap advasivvde
301 dkhtmdiave agnlaqaigr ngqnvrlasq lsgwelnvmt vddlqakhqa eahaaidtft
361 kyldidedfa tvlveegfss leelayvpmk elleidglde atvealrera knalttlala
421 qeeslgdnkp addllnlegl dralafklaa rgvctledla eqgvddladi egmtdekage
481 limaarnicw fgdea
```

NusA 的优缺点

- 可以提高蛋白质的溶解性，可选的标签有 NusA，MBP，GST；
- 这些标签不能用专门的亲和基质纯化，融合蛋白构建时必须与可用于纯化的小亲和标签连用。尤其是当 NusA 蛋白增加融合蛋白溶解性时，一些在大肠杆菌中表达为不溶性的蛋白在与 NusA 在 N 端融合时则变成可溶。但是由于它的分子量较大，导致靶蛋白的得率相对降低；
- NusA 本身不具有独立的纯化标签功能，所以要与其它标签如 His 标签联用；
- NusA 对蛋白下游应用会有影响，如蛋白需进行结构分析（晶体衍射或核磁共振）。

SUMO（小泛素相关修饰物）

SUMO 标签蛋白是一种小分子泛素相关修饰蛋白，是存在于真核生物中高度保守的参与蛋白质小泛素化相关修饰的一类大蛋白。与 GST、MBP 或 NusA 相比，SUMO 不仅可以作为重组蛋白表达的融合标签还具备分子伴侣的功能，能促进蛋白的正确折叠，对热和蛋白酶具有耐受性，更有助于保持目的蛋白的稳定性。此外，SUMO 标签有着与其配套的蛋白酶（专一性强），此蛋白酶识别的是 SUMO 的三级结构，切割的特异性极高，不存在任何氨基酸的残留，因此适用于重组蛋白表达。

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

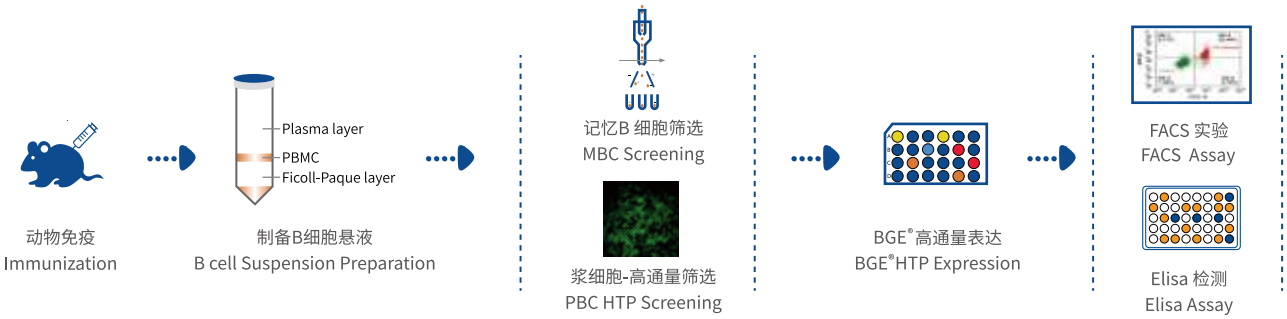
- 支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫
- 记忆B细胞 & 浆细胞双筛选，保证B细胞多样性
- 单细胞扩增阳性率高，无需刺激培养，减少多样性损失
- 重轻链天然配对，亲和力更优
- 高通量，周期短，单抗发现快至29天
- ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

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



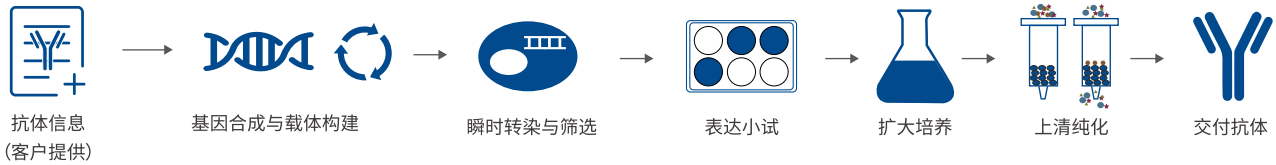
Recombinant Antibody Expression Service

2 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、$(Fab')_2$、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

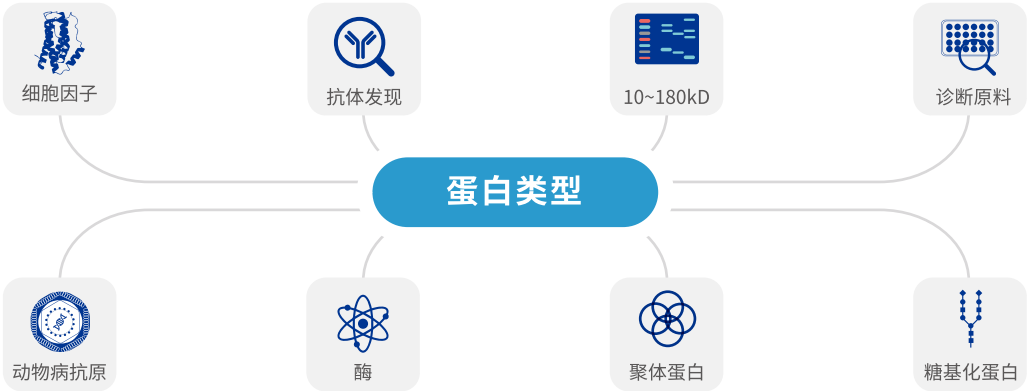


Recombinant Protein Expression Service

3 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。

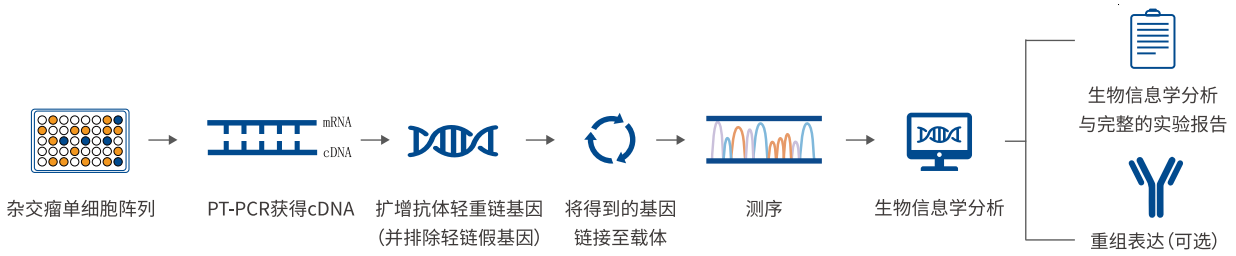
应用场景

- 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κ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

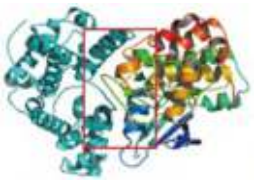
服务流程



5 Biomolecular Interaction Analysis Service
分子间相互作用检测

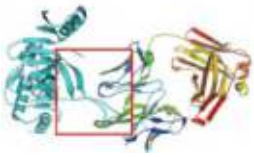
德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振（SPR）平台及生物膜干涉技术（BLI）平台，能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down，免疫共沉淀，酵母双杂交等相比，具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

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。

6 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

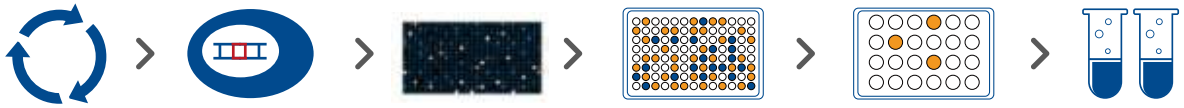
7 Stable Cell Line Development Service
生产型稳转细胞株构建

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	百k级筛选通量	可视化筛选结果	稳定高产
从DNA到细胞株 较传统方法快近100天	一次筛选640k细胞 优选高表达细胞株	先进DeepLight®平台 高表达细胞株实时成像	可稳定转代50代 重组单抗可达5 g/L