

原核蛋白可溶性表达策略及实验方案

可溶性表达策略

大肠杆菌根据表达部位的不同可将蛋白表达的形式分为 3 种：第 1 种为胞外分泌，即目的蛋白被分泌到培养基中。这种方式表达的蛋白容易纯化，不易降解，但通常只有少量的蛋白质可以分泌到细胞外；第 2 种为周质空间表达，这种方式表达的蛋白存在于周质间隙中，外周质的氧化环境有利于蛋白质的正确折叠，在向外周质转移的过程中，信号肽在细胞内剪切，更有可能产生目的蛋白的天然 N 末端；第 3 种为胞内表达，这种表达易形成无活性的包涵体，需要经过繁琐的变性、复性过程才能得到有活性的蛋白。

因为多数蛋白不能够进行分泌表达，且表达量较少，所以分泌蛋白表达方法很少被使用；现阶段实验科研中常用的方法是融合型蛋白表达，包括蛋白上清表达和包涵体复性，以上两种方法均可获得大量的可溶性蛋白。有关通过蛋白复性获得可溶性蛋白请参见《包涵体蛋白复性的方法操作》，这里主要从条件优化的角度讨论第一种方法。

降低重组蛋白合成的速率

可溶性蛋白的产率取决于蛋白的合成速率，蛋白的折叠速率，以及聚集的速率。高水平表达时，肽链聚集的速率一旦超过折叠速率，就会形成包涵体。因此，降低重组蛋白合成的速率有利于提高重组蛋白的可溶性表达。常用的方法有培养温度的优化、挑选合适的启动子、诱导剂和诱导条件的优化等。

密码子优化

密码子的使用对外源基因的表达水平有重要的影响。密码子优化就是根据表达系统对密码子的偏好性进行优化筛选。经过优化的基因序列往往能提高 mRNA 二级结构的稳定性，有利于新生肽段的正确折叠，提高外源活性蛋白的表达。值得注意的是，稀有密码子存在通常会对蛋白表达产生负面影响，在转录过程中稀有密码子的位置以及转录的速率都会影响密码子的翻译，但在某些基因中使用稀有密码子则能显著降低肽链的延伸速率。

启动子的选择需要从启动子强度、漏表达程度、诱导性及经济因素等方面考虑。在胞内表达中，常采用 T7、PL 等强启动子，表达水平可达菌体总蛋白的 70%。若重组蛋白多以包涵体形式存在，可采用强度较弱的 lac 等启动子以达到一个与表达能力相匹配的翻译速率。

表达温度的选择

大肠杆菌的最适生长温度在 37 ~ 39℃ 之间，但此温度下极易生成包涵体蛋白，降低可溶性蛋白的表达，而低温培养条件下表达外源蛋白能有效地增加可溶蛋白的比例。

表 1 温度对外源蛋白在大肠杆菌中可溶性表达的影响

Table 1 Effect of temperature on the soluble expression of heterologous proteins in *E. coli*

Protein	Promoter	Temperature (°C)	Effect
Ricin A chain ^[40]	P _L	37 or 42	Soluble at 37 °C; aggregated at 42 °C
Yeast-α-glucosidase ^[41]	tac	22 or 37	5-fold increase in activity at 22 °C
Human interferon-γ ^[42]	trp	30 or 37	16.5-fold less insoluble at 30 °C
Human interferon-α ^[42]	T7	30 or 37	2.5~3.0-fold more soluble at 30 °C
Murine protein Mx ^[42]	trp	30 or 37	50% soluble at 30 °C; insoluble at 37 °C
Gloshedobin ^[43]	T7	15~40	More soluble at lower temperatures
D-carbamoylase ^[44]	T7, tac	25 or 37	4.5-fold increase in activity at 25 °C
Isopenicillin-N-synthase ^[45]	T7	25 or 37	10%~29% more soluble at 25 °C
D-amino acid oxidase ^[46]	T7	15, 28 or 37	More soluble at 15 and 28 °C

由表可知：不同的外源蛋白低温表达时，可溶性蛋白的表达水平有明显提高。但培养温度有一定下限（8 ~ 10℃），在此温度以下，蛋白基本上停止表达。降低培养温度有利于重组蛋白合成速率的降低，因为蛋白质的合成较慢，新合成的蛋白质会有更充分的时间折叠，增加蛋白的正确折叠率的同时降低重组蛋白的降解速率。

培养基的组成

培养基的组成对可溶外源蛋白的表达有显著影响。一般情况下，蛋白表达采用合成培养基，但合成培养基往往又存在菌体生长较慢和菌体浓度较低的问题。外源蛋白的表达显著地受葡萄糖浓度的影响，在诱导表达时期，需尽量保持低水平的葡萄糖，可以用甘油代替葡萄糖作为表达外源蛋白的碳源是解除葡萄糖效应的有效途径之一。在诱导时期，流加营养物质也有可能显著提高可溶蛋白表达。考虑以下几点也可以提高可溶性蛋白的表达量：

向培养基中添加蛋白抑制剂也能提高可溶蛋白量；

1. 外源蛋白二硫键的形成是一个酶依赖性反应过程，向培养基中添加适量的金属离子，可能提高这些酶类的活性，因此也能增加可溶蛋白的表达量；
2. 某些外源蛋白的活性和稳定性与某些金属离子密切相关，因此向培养基中添加外源蛋白所需金属离子也可能提高蛋白的可溶性和稳定性；
3. 良好的通气能有效降低培养基中对菌体表达蛋白有重要影响的 CO₂ 和乙酸的浓度，也有可能获得高产量的活性蛋白；
4. 培养基的 pH 值也会对可溶蛋白的表达产生重要影响，需要根据菌体和目的蛋白的特点选择合适的 pH 值。

诱导条件优化

诱导时间和诱导剂的用量也是控制可溶性外源蛋白表达的重要因素。

诱导剂种类及其浓度都会对外源蛋白表达产生重要影响，应根据所采用的表达系统(比如启动子的强弱)和外源蛋白的特点优化选择。摇瓶培养时，应选用低菌体浓度诱导，因为在低菌浓度下菌体处于对数生长期，生长活跃，有利于表达可溶性蛋白。然而，如果能保证合理的补料与充分的通气，在较高菌浓度下诱导也同样可能获得可溶蛋白的高效表达。在某些情况下，诱导剂的流加能显著提高可溶蛋白的表达水平。

与分子伴侣或折叠酶共表达

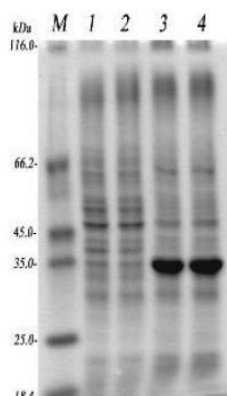
分子伴侣的功能主要是通过阻止或校正不合理的疏水结合来帮助肽链形成正确的三维结构。

大肠杆菌的分子伴侣是由 2 个类型的蛋白质构成的，分别是 Hsp60 蛋白和 Hsp10 蛋白，二者都包含疏水区域，这些区域可与未折叠或错误折叠的多肽链结合，经过一个依赖 ATP 的过程帮助蛋白正确折叠。将几种分子伴侣同时表达，有可能获得比单独使用更好的效果。需要注意的是，共表达分子伴侣应根据重组蛋白自身的特点进行选择。还有一个需要考虑的是培养温度，温度可能会对共表达分子伴侣的效果产生重要的影响。

案例介绍——可溶性蛋白条件优化

一、目的蛋白是否表达

1. 挑取一单菌落接种于含氨苄(Amp, 终浓度为 100g/mL)的 3mL 液体 LB 培养基中 37°C, 250rpm 培养过夜；
2. 将过夜培养菌液以 1 : 100 转接于含上述抗生素的 100mL 液体 LB 中，37°C, 250rpm, 3.5h (大量培养至 OD600 = 0.6 左右)；
3. 取出 1 mL 菌液为未诱导的电泳对照，剩余培养液加入诱导物 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 继续振荡培养 4h；
4. 以未诱导菌液与 IPTG 诱导后菌液作对比，SDS-PAGE 检测。结果如下：



- 1 : pET-32aA3 未诱导
2 : pET-32aA3 未诱导
3 : pET-32aA3 诱导后
4 : pET-32aA3 诱导后

由图可知，目的蛋白经 IPTG 诱导后明显表达，分子量约为 35kd。

二、表达的情况，是可溶还是沉淀

1. 将上述的 37°C 诱导菌液离心 (4°C, 12000g, 5min), 弃上清 (LB 培养液), 沉淀重悬于 0.9% NaCl 溶液洗菌;
2. 将重悬于 0.9% NaCl 的菌体溶液离心 (4°C, 12000g, 5min), 弃上清 (0.9% NaCl 洗菌液), 得菌体, 称菌体重量, 重悬于 8mL PBS (pH 7.0) 缓冲液, 缓冲液用量根据 50~100mg/mL 的菌液终浓度;
3. 超声破菌: 冰浴条件下, 超声波破碎大肠杆菌, 超声设置如下功率:
400W, 工作: 15s, 间隔: 45s, 全程时间: 30min (30 次左右) 以菌液由白变透明, 且不粘稠为依据;
4. 将超声波破碎的菌液离心 (4°C, 12000g, 15min), 分别收集上清和沉淀, 各取 1mL, 加入 1mL 2×上样缓冲液, 沸水浴 10min, SDS-PAGE 检测。



1 : pET-32aA3 诱导上清
2 : pET-32aA3 诱导沉淀

由上图可知, 目标蛋白在上清也有表达, 即存在可溶性的表达, 但是量很少, 大部分也包涵体的形式存在 (沉淀中), 而包涵体的存在也证明了蛋白表达量很高, 上清可溶蛋白的可操作性等因素都优于对包涵体蛋白的分离纯化, 所以可通过探索可溶表达条件, 最终来加大上清蛋白的含量, 以利于下一步实验的进行。

三、探索可溶表达条件

影响包涵体形成的因素有很多, 如诱导温度, 诱导时间, IPTG 诱导表达浓度, 摇床转速等等, 所以设定在低 IPTG 浓度下 (0.1 mmol/L), 在不同温度, 诱导时间下的表达对照:

- 37°C 250rpm 5h
- 30°C 180rpm 10h
- 23°C 90rpm 30h

过程: 挑取一单菌落接种于含氨苄(Amp, 终浓度为 100g/mL)的 3mL 液体 LB 培养基中 37°C, 250rpm 培养过夜。将过夜培养菌液以 1:100 转接于含上述抗生素的 50mL+50mL+60mL 液体 LB 中, 37°C, 250rpm, 3.5h (大量培养至 OD600 = 0.6 左右)。从 60mL 培养液中取 10mL 作为未诱导对照, 标记 3 个 50mL LB 培养菌液:

- 37°C 250rpm 5h
- 30°C 180rpm 10h

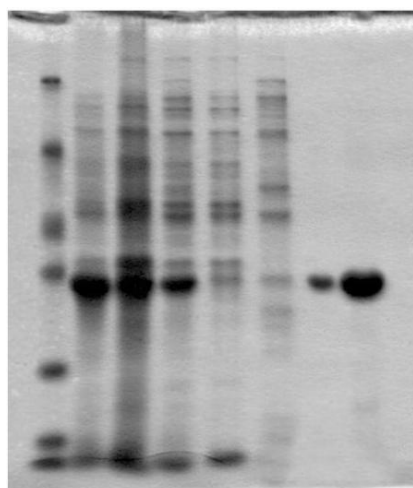
- 23°C 90rpm 30h

都分 5 次取样：

- 37°C 每一小时取样一次（取 10mL）编号为：371、372、373、374、375
- 30°C 每二小时取样一次（取 10mL）编号为：301、302、303、304、305
- 37°C 每五小时取样一次（取 10mL）编号为：231、232、233、234、235

诱导培养结束后，将上述样品分别破菌离心，得上清与沉淀，加 2× 上样缓冲液，沸水浴 10min，SDS-PAGE 检测。

通过实验测定，选取不同温度下的最优可溶表达做比较（234,303,373），结果如下：



1：234 上清

2：234 沉淀

3：303 上清

4：303 沉淀

5：373 上清

6：373 沉淀

最终经过比对，确定 23°C条件下，明显的提高了上清目的蛋白的含量，并且存在可溶表达平衡。20 个小时后，蛋白表达将以包涵体的形式存在，即不论如何改变条件，可溶表达已经达到极限。所以无需探索更低温度等条件。

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



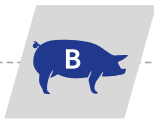
兔



羊驼



人源化小鼠



猪



犬

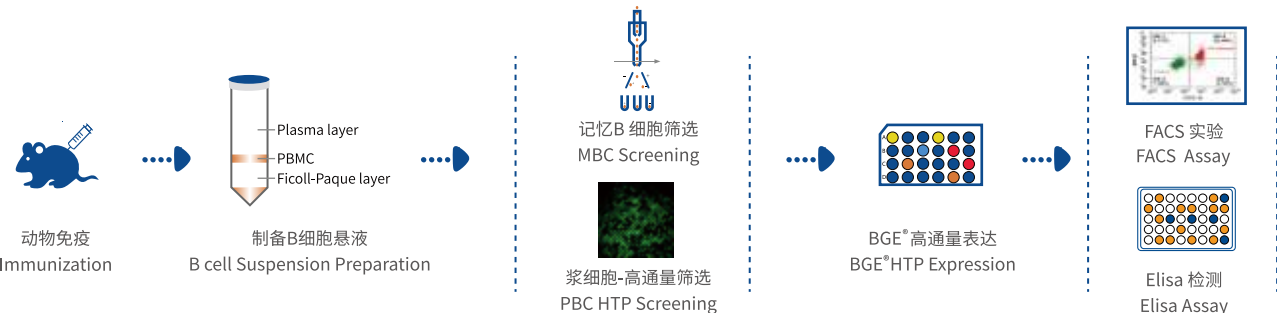


绵羊



人

服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

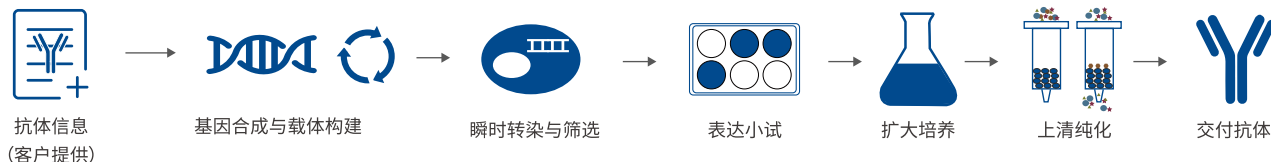
重组抗体表达

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

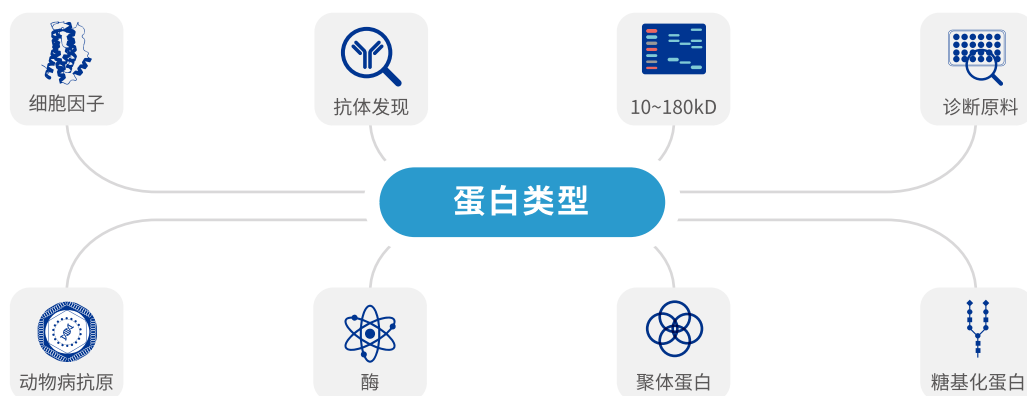


Recombinant Protein Expression Service

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。

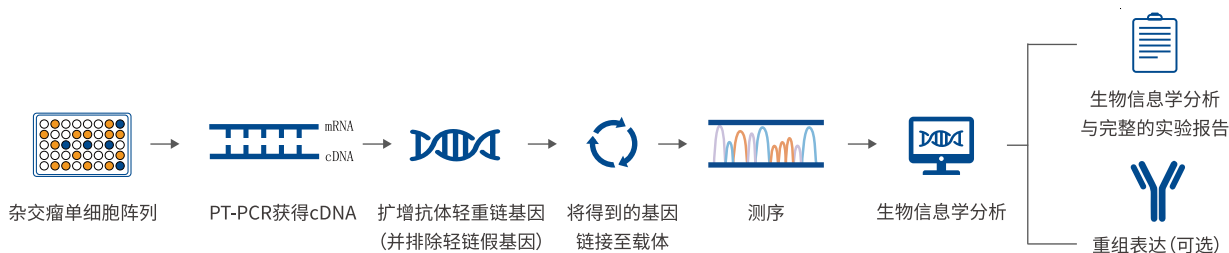
应用场景

- 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

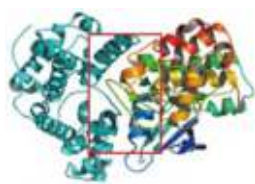


5 Biomolecular Interaction Analysis Service

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



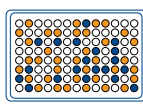
基因合成&质粒抽提



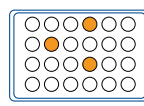
稳定转染



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