

包涵体复性注意事项和常见问题解析

包涵体复性注意事项

1. 最适 pH 值范围为 8.0-9.0 之间；
2. 温度适宜选择 4℃；
3. 复性时间一般为 24-36 小时；
4. 低分子化合物 如 L-Arg 有助于增加复性中间产物的溶解度；脲、盐酸胍、烷基脲、以及碳酸酰胺类等，在非变性浓度下是很有效的促进剂，都可阻止蛋白聚集；Tris 对蛋白质复性有促进作用；EDTA 可以防止蛋白降解；
5. 首先要获得较高纯度的包涵体；
6. 包涵体溶解要彻底，一般应使溶解液体量较大，不要怕蛋白被稀释，要有助溶措施；
7. 透析前后均要离心；
8. 包涵体要彻底洗涤干净，洗涤液中加入适量 Triton-X100；
9. 包涵体溶解后装入透析袋在复性液中复性；
10. 复性完毕在低浓度的缓冲液中连续缓慢透析 12-24h；
11. 复性率的测定时要据变性蛋白和非变性蛋白的光学性质不同测定
12. TritonX100、SDS 这一类去垢剂最后不易去除，在制药行业中一般不允许采用。用 Triton 洗涤有些包涵体效果不是很好。包涵体洗涤是纯化极为重要的一步，改变培养条件，再洗涤包涵体，有时可以在上柱前已经只剩下 3-4 条杂带，这样后续的纯化就很方便了。
13. 复性时的蛋白浓度一般为 0.1-1.0mg/ml，太高的浓度容易形成聚体沉淀，太低的浓度不经济，而且很多蛋白在低浓度时不稳定，很容易变性。

包涵体复性常见问题分析

包涵体复性原则

低浓度，平缓梯度，低温。

怎样洗涤包涵体？

通常的洗涤方法一般是洗不干净的，可以先把包涵体用 6M 盐酸胍溶解充分，过滤除去未溶解的物质，注意留样跑电泳，然后用水稀释到 4M，离心把沉淀和上清分别跑电泳，如此类推可以一直稀释到合适的浓度，可以找到一个合适去除杂质的办法，其实这就是梯度沉淀的方法，比通常的直接洗脱效果好。

对于尿素和盐酸胍该怎么选择

尿素和盐酸胍属中强度变性剂，易经透析和超滤除去。它们对包涵体氢键有较强的可逆性变性作用，所需浓度尿素 8-10M，盐酸胍 6-8M。尿素溶解包涵体较盐酸胍慢而弱，溶解度为 70-90%，尿素在作用时间较长或温度较高时会裂解形成氰酸盐，对重组蛋白质的氨基进行共价修饰，但用尿素溶解具有不电离，呈中性，成本低，蛋白质复性后除去不会造成大量蛋白质沉淀以及溶解的包涵体可选用多种色谱法纯化等优点，故目前已被广泛采用。

盐酸胍溶解能力达 95%以上，且溶解作用快而不造成重组蛋白质的共价修饰。但它也有成本高、在酸性条件下易产生沉淀、复性后除去可能造成大量蛋白质沉淀和对蛋白质离子交换色谱有干扰等缺点。

8M 尿素溶解的包涵体溶液应如何保存？

在 4 度放置半个月，都没什么问题。在室温放置超过 48 小时，可能会对目的蛋白有影响，因为尿素在碱性条件下可使一些氨基酸酰基化，所以早些处理 BI 溶液比较好。

复性时的蛋白浓度

一般使用浓度为 0.1-1.0mg/ml，太高的浓度容易形成聚体沉淀，太低的浓度不经济，而且很多蛋白在低浓度时不稳定，很容易变性。

蛋白复性后浓度低

蛋白可能是在复性的过程中发生降解了。

可以将复性好的蛋白浓缩一下跑胶看看。复性过程一般都是低浓度蛋白，需要保证分子间有足够的折叠空间。一些未正确折叠的蛋白就存在于沉淀中，可能沉淀看不出来，复性后的蛋白高速离心看看。

复性中蛋白析出是怎么回事？该怎么处理？

出现蛋白析出，肯定是条件变化太剧烈了。

复性应该采取复性液浓度和 PH 值逐渐变化的方法，例如根据包涵体的溶液成分，每隔 1 个 PH 或浓度值配置一种溶液，逐步透析到正常。此外透析时必须浓度极低，条件温和，使蛋白质能够正确折叠。但是复性的比率应该很低。

若加变性剂尿素可加到 2M，盐酸胍可加到 1-1.5M；

另外可将甘油浓度增加，范围可在 $\leq 30\%$ ，且在复性样品中也可加适量甘油。

复性效果的检测

根据具体的蛋白性质和需要，可以从生化、免疫、物理性质等方面对蛋白质的复性效率进行检测。

凝胶电泳：一般可以用非变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳可以检测变性和天然状态的蛋白质，或用非还原的聚丙烯酰胺电泳检测有二硫键的蛋白复性后二硫键的配对情况。

1. 光谱学方法：可以用紫外差光谱、荧光光谱、圆二色性光谱（CD）等，利用两种状态下的光谱学特征进行复性情况的检测，但一般只用于复性研究中的过程检测。
2. 色谱方法：如 IEX、RP-HPLC、CE 等，由于两种状态的蛋白色谱行为不同。
3. 生物学活性及比活测定：一般用细胞方法或生化方法进行测定，较好的反映了复性蛋白的活性，值得注意的是，不同的测活方法测得的结果不同，而且常常不能完全反映体内活性。
4. 黏度和浊度测定：复性后的蛋白溶解度增加，变性状态时由于疏水残基暴露，一般水溶性很差，大多形成可见的沉淀析出。
5. 免疫学方法：如 ELISA、WESTERN 等，特别是对结构决定簇的抗体检验，比较真实的反映了蛋白质的折叠状态。

变性的融合蛋白可以制备多抗或者单抗吗？

变性蛋白只是天然蛋白伸直了的产物，用来免疫动物具有更强的抗原性。只是天然蛋白中被包在内部的抗原决定簇也会暴露出来，如果用该变性抗原制备的抗体来检测变性抗原是可以的，如果用来检测天然蛋白，可能会有假阳性。做单抗也可以，同样道理，筛选出的单抗可能对抗的抗原决定簇处于天然抗原的内部，是否能用还要看将来该单抗用来干什么。

纯化后的可溶性融合蛋白可以直接用于制备多抗吗？

免疫动物要求抗原体种尽量小。在这种小体积的情况下，缓冲液里的小分子成分只要没毒影响就不大，可以不用考虑。

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

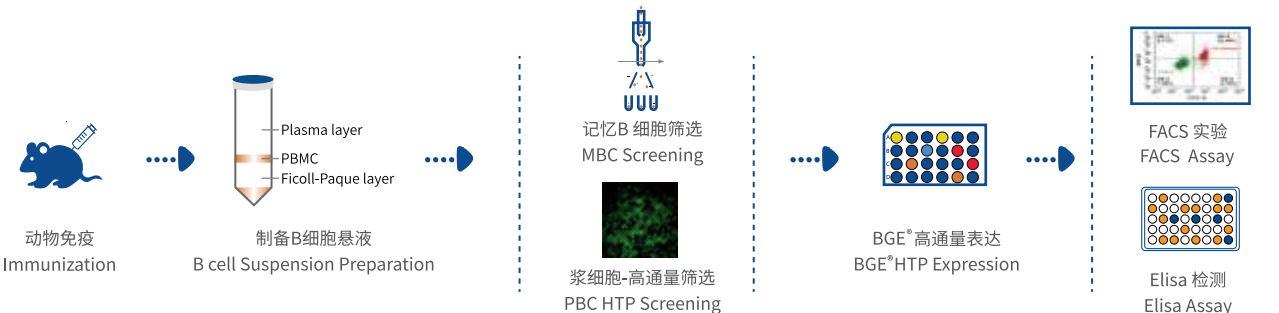


绵羊



人

服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

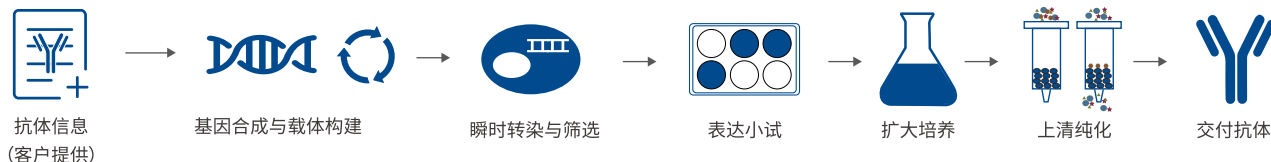
重组抗体表达

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

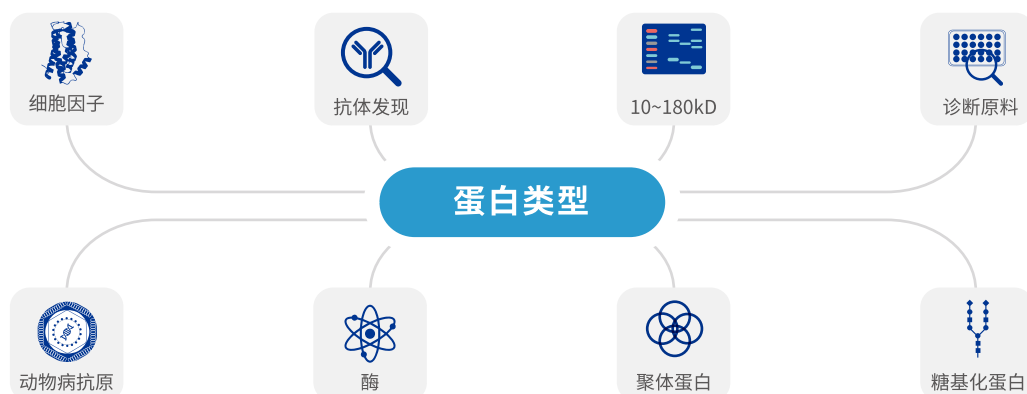


Recombinant Protein Expression Service

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。

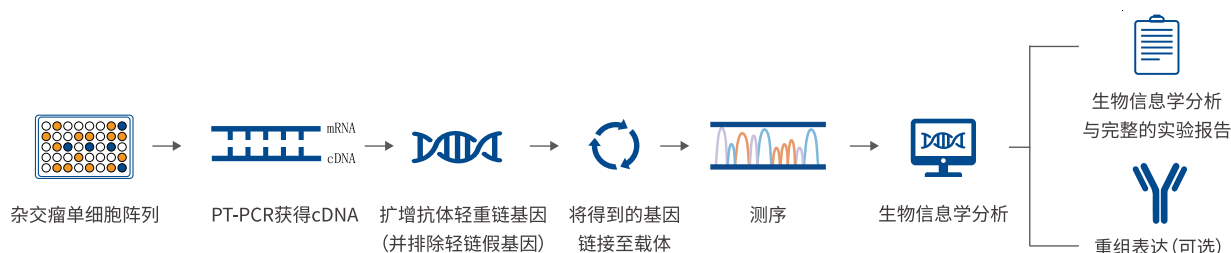
应用场景

- 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



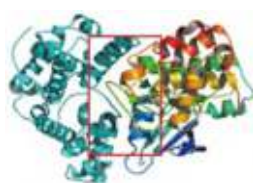
5

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。

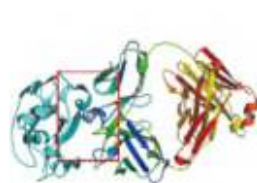
检测范围



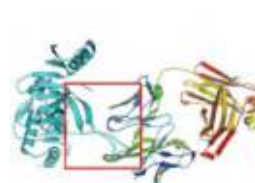
蛋白和蛋白



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



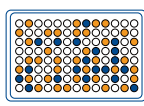
基因合成&质粒抽提



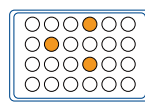
稳定转染



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