

包涵体纯化蛋白复性操作流程

包涵体的纯化和复性总结

包涵体折叠复性的方法应具备以下几个特点：较高的活性蛋白质回收率；复性产物易于与错误折叠蛋白质分离；折叠复性后能够得到较高浓度的蛋白；折叠复性方法易于放大等。蛋白复性的过程通常分为以下几个步骤：

包涵体的洗涤

包涵体在溶解之前需要进行洗涤，包涵体中主要含有重组蛋白，但也有一些杂质，如一些外膜蛋白、质粒 DNA 等，这些杂质会与包涵体粘连在一起，可以通过洗涤去除大多数杂质，但无法将杂蛋白去除干净。

包涵体的洗涤通常选用浓度较低的变性剂，如 2M 尿素在 50mM Tris, pH7.0-8.5, 1mM EDTA 中洗涤包涵体。此外可以用温和去垢剂 TritonX-100 洗涤去除膜碎片和膜蛋白。同时，因为去垢剂的洗涤能力会随溶液离子强度升高而加强，所以在洗涤包涵体时可加入低浓度的尿素或高浓度的 NaCl，使包涵体的纯度达到 50%以上。

包涵体的溶解

变性剂如尿素、盐酸胍，主要是通过离子间的相互作用，打断包涵体蛋白分子间的各种化学键，使多肽延伸。盐酸胍是较尿素强的变性剂，它能溶解尿素不溶的包涵体。SDS、正十六烷基三甲基铵氯化物、Sarkosyl 等也可以破坏蛋白内的疏水键，溶解一些包涵体蛋白质。

另外，从某些含有半胱氨酸的蛋白质中分离出的包涵体，通常含有一些链间形成的二硫键和链内的非活性二硫键，这就还需加入还原剂，如巯基乙醇、二巯基苏糖醇（DTT）、二巯赤藓糖醇、半胱氨酸等。这种还原性试剂能够同半胱氨酸形成各种二硫化物中间体，也会被复性用的二硫化物置换试剂所取代。二硫键的形成和断裂是可逆的，直到最有利的蛋白二硫键形成，这个平衡才会被破坏。

常用变性剂对比

尿素	较盐酸胍慢而弱，溶解度为 70-90% (8-10M)	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 溶解的包涵体可选用多种色谱法纯化
盐酸胍	溶解能力达 95%以上，且溶解作	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

(6-8M) 用快而不造成重组蛋白质的共价 蛋白质沉淀

修饰

对蛋白质离子交换色谱有干扰

包涵体的复性

复性是指通过去除变性剂使目标蛋白从完全伸展的变性状态恢复到正常的折叠结构，同时去除还原剂确保二硫键正常形成。一般在尿素浓度 4M 左右时复性过程开始，到 2M 左右时结束；盐酸胍可以从 4M 开始，到 1.5M 时结束。

复性方法主要采用稀释复性，透析复性和柱上复性，具体对比如下：

复性技术	简介	优点	缺点
稀释复性	用折叠缓冲液快速稀释溶解的包涵体蛋白质溶液，达到降低变性剂浓度的目的，使去折叠的蛋白质进行再折叠	简单	慢 蛋白会被稀释到很低浓度 体积增加较大，变性剂稀释速度太快，不易控制
透析复性	通过逐渐降低外透液浓度来控制变性剂去除速度	简单 不增加体积	慢 使用大量缓冲液 不适合大规模操作，无法应用到生产规模
分子筛层析	分子筛效应可将蛋白质和小分子变性剂分离，实现溶液交换和蛋白质的折叠	在一步操作中直接进行自动化复性并纯化	样品体积受限
离子交换层析	减少导致蛋白质聚集的分子间相互作用，可将蛋白质结合在分离介质上，达到溶液中变性剂浓度的稀释和蛋白质的折叠	快速并简单 直接进行自动化	应避免使用与离子交换自相反电荷的添加剂

复性的检测

根据具体的蛋白质性质和需要，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。

1. 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。

2. 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。
3. 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。
4. 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。
5. 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。
6. 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。

蛋白复性过程的添加剂

1. 共溶剂：如 PEG6000-20000，据说可以可逆的修饰折叠中间体的疏水集团，此外由于阻止了蛋白质分子间的相互接触的机会，也可能对复性效率的提高起作用。一般的使用浓度在 0.1%左右，具体条件可根据实验条件确定。
2. 二硫键异构酶（PDI）和脯氨酸异构酶（PPI）：PDI 可以使错配的二硫键打开并重新组合，从而有利于恢复到正常的结构，此外在复性过程中蛋白质的脯氨酸两种构象间的转变需要较高能量，常常是复性过程中的限速步骤，而 PPI 的作用是促进两种构象间的转变，从而促进复性的进行。
3. 分子伴侣，即热休克蛋白（HSP），是一种没有蛋白质特异性的促进折叠的蛋白因子，研究发现很多蛋白在缺乏分子伴侣时无法自己正确的折叠。有人构建了与伴侣分子共同表达的菌株，据说效果不错。不过在生产中还没有看到 2 和 3 的应用的例子。
4. 0.4-0.6ML-Arg：成功的应用于很多蛋白如 t-PA 的复性中，可以抑制二聚体的形成。
5. 甘油：增加黏度，减少分子碰撞机会，一般使用浓度在 5%-30%。
6. 辅助因子：添加蛋白质活性状态必须的辅助因子如辅酶辅基等或蛋白配体等很多时候对蛋白质正确的折叠是有利的。 色谱法：通过将目标蛋白结合到层析柱上，减少蛋白分子间的相互影响，该方法得到越来越多的应用，常用的色谱有 SEC、HIC、IEC、IMAC 等。

案例介绍

包涵体沉淀的溶解、重折叠和离子交换层析

材料和设备

Tiss-Tearor?匀浆器

透析袋 (Spectra/Por?6)

阳离子交换柱

SDS-PAGE 电泳装置

试剂

缓冲液 A (1000mL)

1mol/L Tris-HCl (PH 7.9) 50mL , 50mmol/L

0.5mol/L EDTA 1mL , 0.5mmol/L

5mol/L NaCl 10ml , 50mmol/L

甘油 50mL , 5%

缓冲液 A+50%甘油

脱氧胆酸钠 (DOC)

N-十二烷基胺酸钠 (SKL)

操作程序

用 N-十二烷基胺酸钠溶解包涵体沉淀

1. 加 18mL 缓冲液 A 和 2mL 20% DOC 储存于包涵体沉淀中。用组织破碎器充分重悬沉淀，室温下静置至少 10min。
2. 悬液于 4°C、13000r/min 离心 10min。弃去上清（注意留样，样品 C），为确保沉淀得到充分洗涤，再次按步骤一的操作重悬沉淀。将悬液分成两个相等的部分，编号#1 和#2，于 4°C、13000r/min 离心 10min。
3. 对#1 管中的沉淀，加 19.7mL 的缓冲液 A 和 0.3mL 的 20%SKL 储液。剧烈搅动使沉淀慢慢溶解。然后静置 30min。
4. #1 管中溶解的蛋白悬液，置于 4°C、13000r/min 离心 10min。收集上清液，弃去沉淀。

透析除去去污剂使可溶性蛋白重折叠

1. 对溶解的物料进行蛋白定量测定(制作标准曲线时,必需用含有 0.3% SKL 的牛血清蛋白)。用缓冲液 A+0.3% SKL 稀释,将溶解的蛋白浓度调至 1mg/mL。
2. 用缓冲液 A 将溶解蛋白制备液稀释 10 倍,使蛋白终浓度约为 0.1mg/mL,SKL 终浓度约为 0.03%。
3. 4°C下,溶解蛋白制备物(约 200mL),用 2000mL 缓冲液 A 透析 8h(每 4h,取 150uL 样品,用 HPLC 测定去垢剂含量),同时充分搅拌。然后换新鲜缓冲液并重复。

离子交换层析

7. 从透析袋中移出经透析的蛋白质溶液,4°C、8000r/min 离心 20min,除去所有聚集物。
8. 留上清(样品 J),加载于 POROS 50S 阳离子交换柱,作为后一级的分级分离。
9. 用缓冲液 A 洗涤层析用的介质,然后将其倾入带适配器接头的玻璃柱中,装成一总体积为 5mL 的层析柱。用缓冲液 A+1mol/L NaCl 洗柱。并用缓冲液 A 平衡柱子。
10. 如透析是在低盐环境下进行,则可在室温下以 4mL/min 的流速直接将蛋白样品加载于层析柱上。
11. 用缓冲液 A 洗柱 15min,然后在 60min 内,以 4mL/min 的流速,进行梯度洗脱(0-1mol/L NaCl/缓冲液 A)。检测 260nm 和 280nm 处的吸收,分部收集 4mL 组分。
12. SDS-PAGE 电泳分析各组分,并合并峰组分进行进一步分析。合并的组分可通过对缓冲液 A+50%透析,制备后储存。

更多优质服务推荐



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。

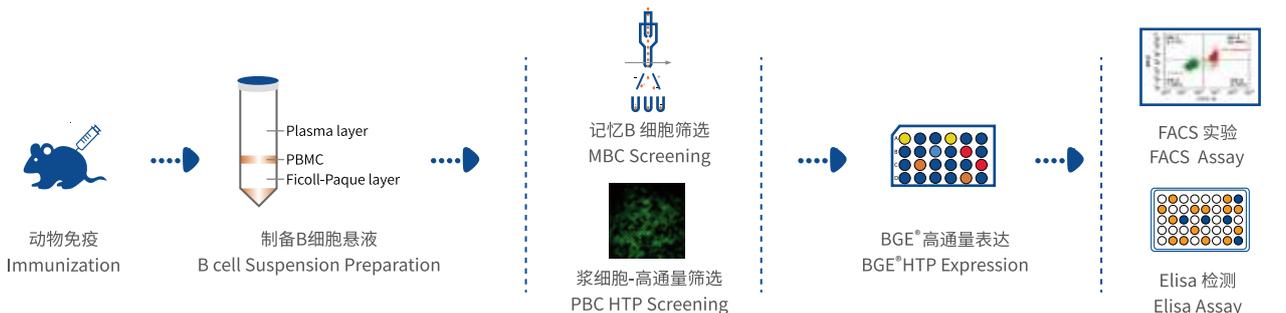
平台优势

- 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



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、(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

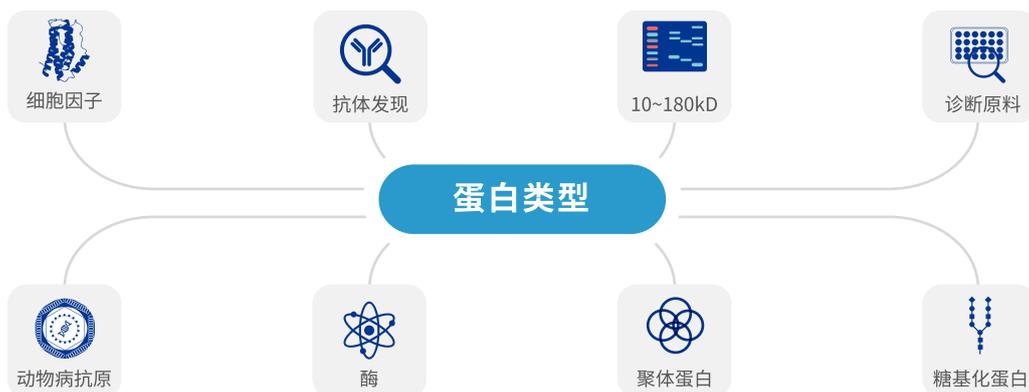


Recombinant Protein Expression Service

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。

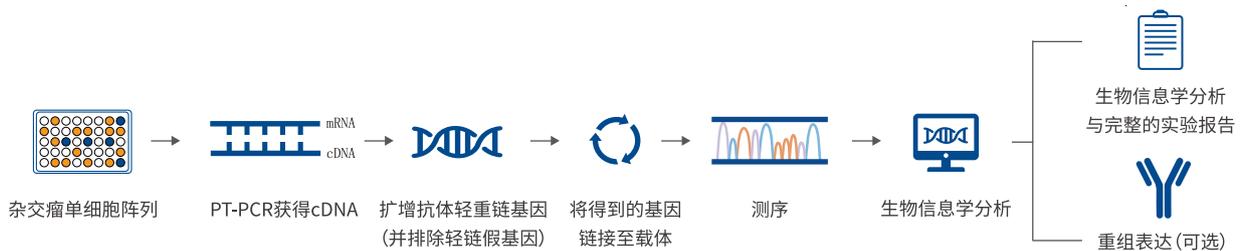
应用场景

- 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



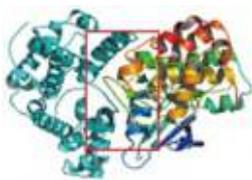
5

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。

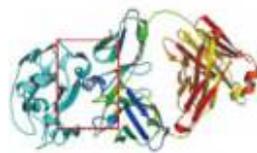
检测范围



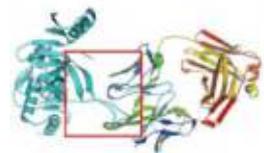
蛋白和蛋白



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



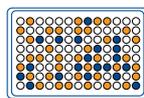
基因合成&质粒抽提



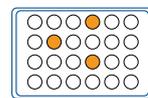
稳定转染



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

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