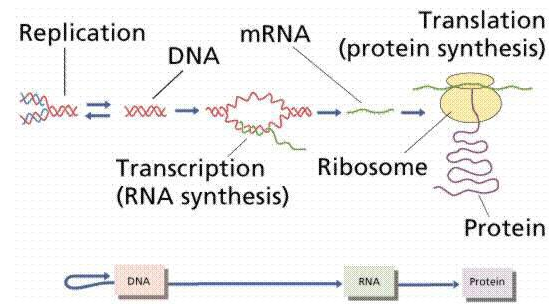


## 蛋白表达与纯化专题

蛋白表达通常是指生物体内蛋白质的合成、修饰以及调控过程。在表达系统的相关研究中，表达是指利用基因重组技术表达蛋白质的过程。本文主要关注后一个话题，着重阐述重组蛋白生产过程中的主要细胞机制。

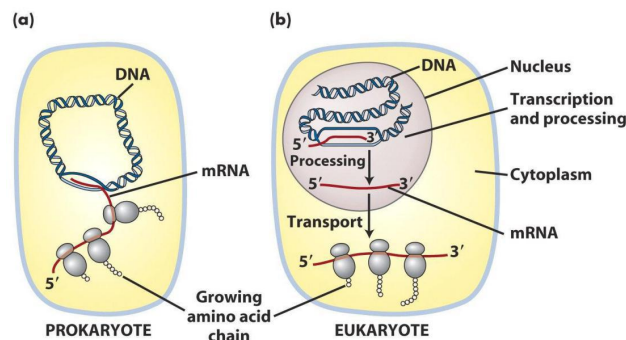
### 蛋白表达与纯化简介

蛋白在细胞内的合成和调控取决于功能的需求，蛋白质的遗传信息都储存在 DNA 的模板中，并由转录过程中产生的信使 RNA ( mRNA ) 进行解码，遗传信息通过一个 mRNA 编码，然后翻译为蛋白质。转录是指遗传信息从 DNA 传递到 mRNA 的过程，而翻译是指蛋白通过 mRNA 指定的序列进行合成的过程。



**转录和翻译的简略示意图，描述了从 DNA 碱基对序列（基因）到形成氨基酸多肽序列（蛋白质）的过程。**

在原核细胞中，转录和翻译是同时进行的。翻译甚至在成熟的 mRNA 转录产物完全合成前就已经开始了。这种转录翻译同时进行的方式被称为转录翻译的耦合 ( coupled )。而在真核细胞中，转录发生在细胞核内，翻译或蛋白质合成的场所则是在细胞质中，两者是分开且依次发生的。



真核和原核的转录翻译对比图

### 转录

原核生物和真核生物的转录的过程都包括三个步骤：起始，延伸和终止。当双链 DNA 解旋并与 RNA 聚合酶结合时转录开始。一旦转录开始，RNA 聚合酶就会从 DNA 中释放出来。转录的过程的调控依赖激活蛋白和阻遏蛋白，同时也与真核的染色质结构有关。在原核生物中，mRNA 的原始转录产物一般不需要加工修饰，翻译往往在转录

完成前就开始了。然而真核细胞中，原始转录产物则需要进一步的加工——除去内含子，mRNA 的 5'端添加“帽子”，mRNA 3'末端在多聚腺苷酸聚合酶参与下加上了一段多个腺嘌呤序列（poly A 尾）。修饰后的 mRNA 移动到细胞质中进行翻译。

## 翻译

翻译或蛋白的合成是一个复杂的过程，包括起始，延长和终止三个步骤。整个过程需要生物大分子的协同作用，如核糖体，转运 RNA（tRNA），mRNA 等；同时还需要很多的蛋白因子和小分子蛋白，如氨基酸，ATP，GTP 以及其它辅助因子。这些特殊的翻译因子存在于翻译的每一步中（详情见下表）。原核和真核的翻译过程整体上是相似的，但在部分过程中依然存在着区别。

在起始阶段，核糖体的小亚基会引发 t-RNA 扫描 mRNA，识别并结合 mRNA 5'端的起始密码子（AUG）。核糖体的大亚基和小亚基在起始密码子处链接并形成起始复合物。蛋白因子和 mRNA 参与到起始密码子的识别和起始复合物形成的过程中。延长阶段，tRNA 会结合到特定的氨基酸上（这通常被称为 tRNA 的装载作用）并在核糖体中聚合形成肽，氨基酸通过转录产物的 mRNA 序列不断添加到正在增长的肽段中。最终，新生多肽在终止密码子处停止翻译。同时，核糖体释放 mRNA，准备开始新一轮的翻译。

## 蛋白合成

原核生物与真核生物翻译过程中的主要组成部分概述

组成	原核	真核
核糖体	30S 和 50S 亚基	40S 和 60S 亚基
模板或 mRNA	转录后，mRNA 转录产物不需要进一步的修饰 mRNA 是多顺反子并包含多个起始位点	转录后，mRNA 除去非编码区（内含子），并且在 mRNA 的 5' 端和 3' 端分别加入“帽子”结构（M7 甲基鸟嘌呤）和聚腺苷酸序列。 “帽子”结构和 poly A 尾在 mRNA 转移到细胞质的过程起到很重要的作用，可以保证翻译的正确性以及 mRNA 在其他功能中的稳定性。 mRNA 通常是单顺反子。
翻译的特点	Shine-Dalgarno 序列存在于 mRNA	翻译的起始发生在两个方面：

转录物中，是核糖体亚基中的一段互补序列。

SD 序列有助于 mRNA 在起始位点与核糖体的结合准确。

新生多肽的第一位氨基酸是甲酰化的甲硫氨酸。

起始因子 三个已知启动因子：IF1，IF2，IF3

延伸因子 EF-Tu，EF-Ts，EF-G

终止或释放因子 RF1 和 RF-2

Cap-dependent 翻译：“帽结构”和帽结合蛋白负责核糖体结合 mRNA 并识别正确的密码子。mRNA 的 5'端第一个 AUG 密码子作为起始密码子，有时 Kozak 序列会出现在起始密码子附近。

Cap-independent 翻译：核糖体与 mRNA 是通过 mRNA 的“内部核糖体进入位点”（IRES）进行结合。三个以上的经磷酸化调节的起始因子，在真核翻译中，启动步骤通常是限制步骤（rate-limiting step）

EF1 ( $\alpha$ ， $\beta$ ， $\gamma$ ) 和 EF2

eRF-1

## 翻译后修饰

翻译后的多肽会采用多种加工方式来完成其蛋白结构或调节细胞活性。翻译后修饰（PTMs）是指各种添加或改变蛋白化学结构的方法，PTMs 在整体细胞生物学中起到至关重要的作用。

翻译后修饰的类型包括：

1. 通过分子伴侣的帮助，多肽折叠成一个能量处于最低的状态球状蛋白。
2. 氨基酸的修饰，如第一个甲硫氨酸残基的去除
3. 二硫键的形成或减少
4. 促进结合功能的蛋白质修饰
  - 糖基化
  - 蛋白异戊二烯化对膜的定位
  - 组蛋白乙酰化修饰 DNA 组蛋白的相互作用
5. 为了保证蛋白活性而添加的官能团：
  - 磷酸化
  - 亚硝基化
  - GTP 结合

## 蛋白表达与纯化的方法

在一般情况下，蛋白质组学研究涉及调查的一个蛋白的许多方面，如结构、功能、修饰、定位或蛋白质的相互作用等。为了研究特定蛋白的生物学调节作用，研究人员通常需要采用生产手段制造出感兴趣的功能蛋白。

对于已知大小和复杂性的蛋白，不能采用化学合成的方法。相反，活细胞及其细胞器通常被作为模板基因合成蛋白的场所。

不同的蛋白质，既可以使用简单的 DNA 综合构建，也可以利用已知的 DNA 序列在体外重组构建。因此，特殊基因的 DNA 模板无论带不带额外的亲和标签序列，均可以构造为表达模板。通过这样的重组 DNA 模板表达出来的蛋白被称为重组蛋白。

### 体内蛋白表达

传统蛋白表达纯化方式包括重组载体转染细胞，细胞培养以及转录翻译目的蛋白。通常情况下，会先裂解细胞提取蛋白，并对提取的蛋白进行纯化。原核细胞和真核细胞的体内蛋白表达系统已被广泛应用，系统的选择取决于表达蛋白的种类，功能活性和预期收益等。

原核表达系统具有易于培养，增长快速和产量高等优点。然而，多域 ( multi-domain ) 真核蛋白在细菌内的表达往往是不成功的，因为细胞无法满足翻译后修饰或分子折叠的需求。同时，许多表达的蛋白很容易形成不溶性的包涵体——如果没有合适的变性剂和复杂的复性程序很难恢复蛋白的天然构型。

哺乳动物体内表达系统虽然会产生活性蛋白，但也有着产量低，生产成本低以及细胞培养时间长等缺点。此外，在体内的表达系统不利于高通量 ( high throughput protein ) 蛋白合成或对宿主细胞有毒性的蛋白表达。

### 体外细胞表达 ( 无细胞 )

无细胞蛋白表达是采用全细胞翻译兼容提取物 ( translation-compatible extracts of whole cells ) 在体外合成蛋白质。原则上，全细胞提取物中含有所有的用于转录，翻译及翻译后修饰的大分子组件。这些组件包括 RNA 聚合酶，调控因子，转录因子，核糖体和 tRNA。

在添加辅助因子，核苷酸和特定的基因模板的情况下，几小时内就可以合成目的蛋白。

虽然这种表达方式无法应用到规模化生产中，但无细胞蛋白表达系统与传统的体内表达系统相比，仍具有很多优势：无细胞表达系统可以使重组蛋白快速合成，免除细胞培养的麻烦；无细胞系统可以使用修饰的氨基酸标签，以及表达会因蛋白酶而快速降解的蛋白。而且通过体外表达的方法，能够同时表达多种不同的蛋白。( 例如，通过从许多不同的重组 DNA 模板中进行一个小规模表达来检测蛋白突变 )

## 更多优质服务推荐

1

SingleB® mAb Discovery Service

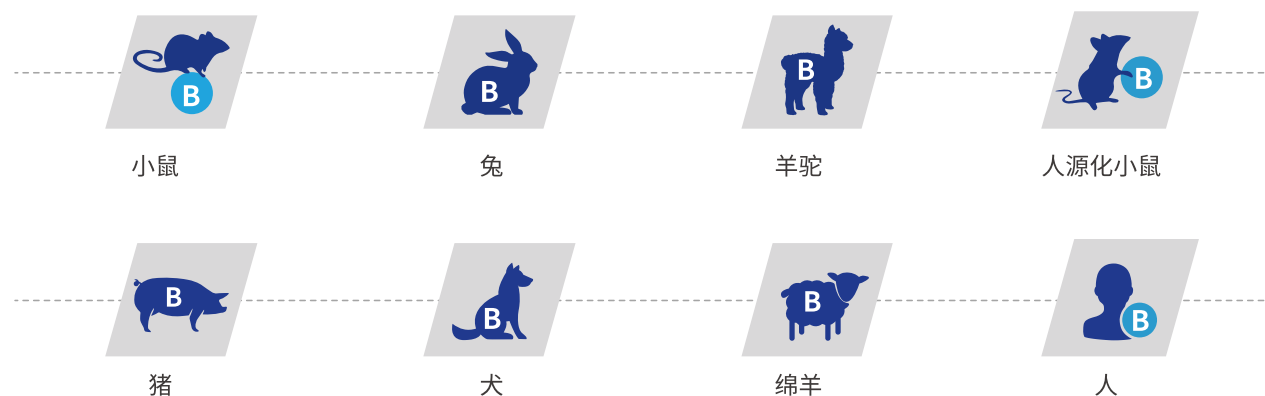
### SingleB®单B细胞快速单抗发现

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。

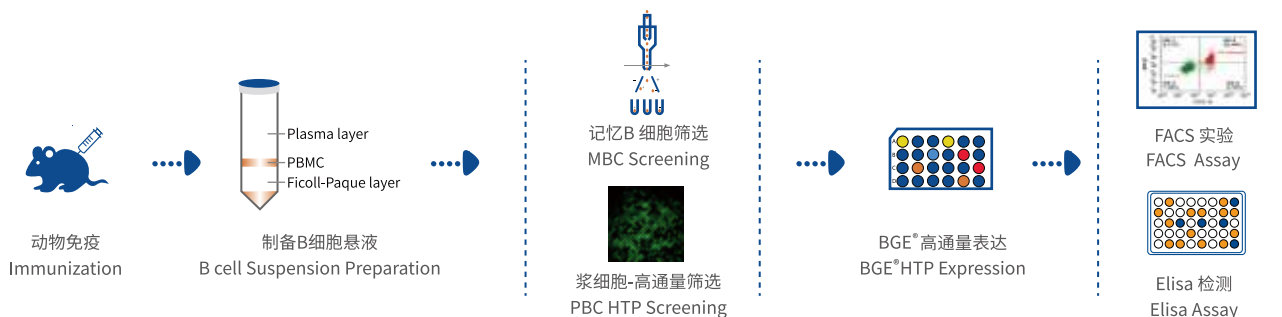
#### 平台优势

- 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



#### 服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

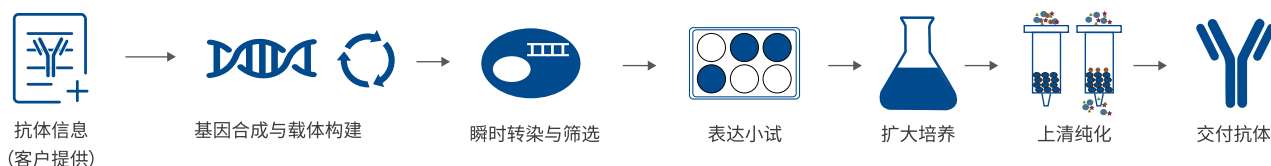
## 重组抗体表达

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')<sub>2</sub>、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

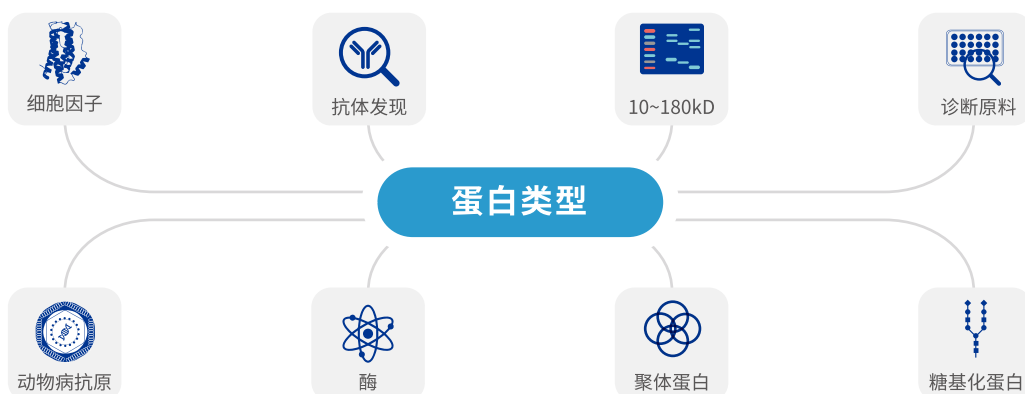


Recombinant Protein Expression Service

## 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。

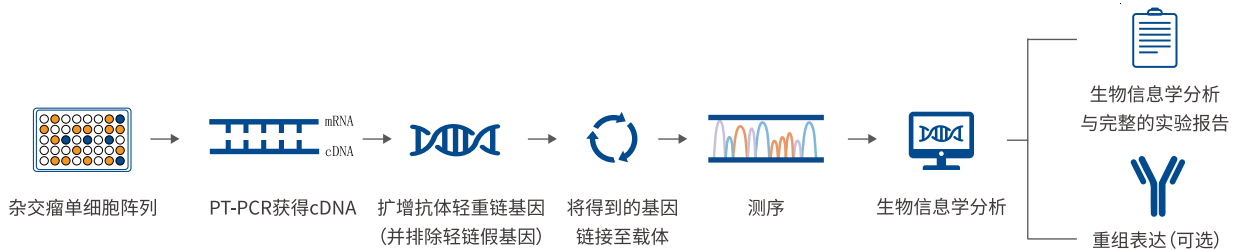
### 应用场景

- 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



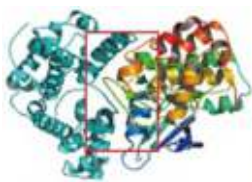
# 5

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

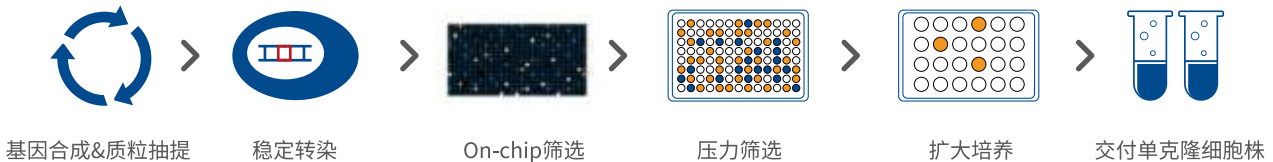
## 生产型稳转细胞株构建

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



### 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