

蛋白纯化方法选择

蛋白纯化的目的是将目标蛋白质从细胞裂解液的全部组分中分离出来,同时仍保留蛋白的生物学活性及化学完整性。蛋白质的分离和提纯工作是一项艰巨而繁重的任务,需根据蛋白的特性选择合适的纯化方法来提高获得的蛋白制品的纯度。

蛋白纯化方法

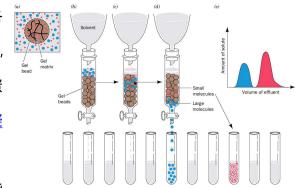
蛋白纯化的原理为:不同蛋白质的氨基酸序列及空间结构不同,导致其在物理、化学、生物学等性质上存在差异, 利用待分离蛋白质与其它蛋白质性质上的差异,即可以设计出一套合理的蛋白纯化方案。

蛋白的纯化大致分为粗分离阶段和精细纯化阶段两个阶段。粗分离阶段主要将目的蛋白和其他细胞成分如 RNA、DNA 等分开,常用的方法为硫酸铵沉淀法。精细纯化阶段的目的是把目的蛋白与其他大小及理化性质接近的蛋白区分开来,常用的方法有:凝胶过滤层析、离子交换层析、疏水层析、亲和层析等。

凝胶过滤层析

凝胶过滤(也叫排阻层析或分子筛)是一种根据分子大小从混合物中分离蛋白质的方法。不同蛋白的形状及分子大

小存在差异,在混合物通过含有填充颗粒的凝胶过滤层析柱时,由于各种蛋白的分子大小不同,扩散进入特定大小孔径颗粒内的能力也各异,大的蛋白分子会被先洗脱出来,分子越小,越晚洗脱,从而达到分离蛋白的目的。一般来说,凝胶过滤层析柱越细、越长纯化的效果越好。凝



胶过滤层析详细介绍

凝胶过滤层析所能纯化的蛋白分子量范围很宽 纯化过程中也不需要能

引起蛋白变性的有机溶剂。缺点是所用树脂有轻度的亲水性,电荷密度较高的蛋白容易吸附在上面,不适宜纯化电荷密度较高的蛋白。

离子交换层析

离子交换层析是一种依据蛋白表面所带电荷量不同进行蛋白分离纯化的技术。蛋白表面通常会带有一定的电荷,电荷的氨基酸残基均匀地分布在蛋白质的表面,在一定条件下可以与阳离子交换柱或阴离子交换柱结合。这种带电分



子与固定相之间的结合作用是可逆的,在改变 pH 或者用逐渐增加离子强度的缓冲液洗脱时,离子交换剂上结合的物质可与洗脱液中的离子发生交换而被洗脱到溶液中。由于不同物质的电荷不同,其与离子交换剂的结合能力也不同,所以被洗脱到溶液中的顺序也不同,从而达到分离的效果。离子交换色谱的基本原理及实验操作

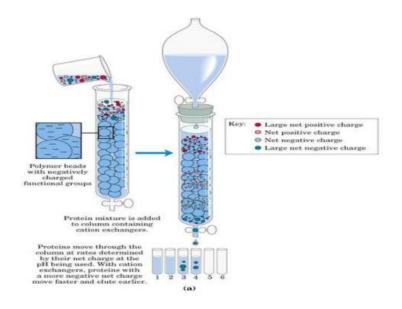
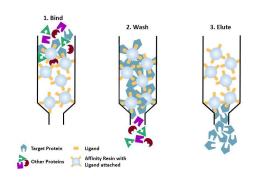


图 2: 离子交换层析纯化蛋白

亲和层析



亲和层析纯化是利用生物大分子物质具有与某些相应的分子专一性可逆结合的特性进行蛋白纯化的技术。该方法

适用于从成分复杂且杂质含量远大于目标物的混合中提纯目标物,具有分离效果好、分离条件温和、结合效率高、分离速度快的优点。亲和层析技术可以利用配基与生物分子间的特异性吸附来分离蛋白,也

可以在蛋白上加入标签,利用标签与配基之间的特异性结合来纯化蛋白。

配基与生物分子之间的特异性吸附

配基:在亲和层析中起可逆结合的特异性物质称为配基。配基可以是酶的底物、抑制剂、辅因子、特异性的抗体等。 亲和层析是根据固定相的配基与生物分子之间的亲和能力不同来进行相互分离的。依据选择性的高低亲和层析可以 分为基团性亲和层析及高选择性(专一性)亲和层析。基团亲和层析一种配基可以吸附多种蛋白,如以三嗪染料为



配基纯化含有糖基的一类蛋白质或糖蛋白,高选择性亲和层析一种配基只能吸附一种蛋白,如单克隆抗体对抗原的特异性的吸附。

标签纯化

利用基因工程技术在蛋白的氨基端或羧基端加入少许几个额外氨基酸,这个加入的标记可用来作为一个有效的纯化依据。蛋白纯化标签选择

GST 标签纯化:在蛋白质序列中加入谷胱甘肽 S 转移酶(GST),然后利用 Glutathione Sepharose 4B 作亲和纯化,再利用凝血酶或因子 Xa 切开。

His 标签纯化:组氨酸标记(His-tag)是最通行的标记之一,在蛋白质的氨基端加上6~10 个组氨酸,在一般或变性条件(如8M 尿素)下借助它能与 Ni2+螯合柱紧紧结合的能力,用咪唑洗脱,或将 pH 降至5.9 使组氨酸充分质子化,不再与结合 Ni2+使之得以纯化。His 标签纯化介绍

疏水作用层析

疏水作用层析是利用盐-水体系中样品分子的疏水基团和层析介质的疏水配基之间疏水力的不同而进行分离的一种层析方法。该法利用了蛋白的疏水性,蛋白经变性处理或处于高盐环境下疏水残基会暴露于蛋白表面,不同蛋白疏水残基与固定相的疏水性配体之间的作用强弱不同,依次用从高至低离子强度洗脱液可将疏水用作由弱至强的组分分离。

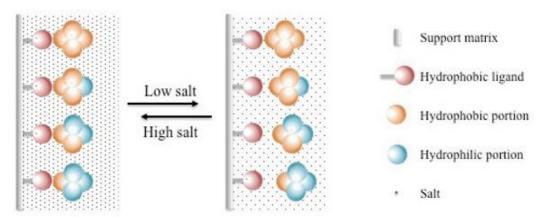


图 4: 疏水作用层析纯化蛋白

疏水作用层析实验操作成本低且纯化得到的蛋白具有生物学活性,是一种通用型的分离和纯化蛋白质的方法。该实验遵循"高盐上样,低盐洗脱"的原则:高浓度盐水溶液中蛋白质在柱上保留,在低盐或水溶液中蛋白质从柱上被



洗脱,特别适用于浓硫酸铵溶液沉淀分离后的母液以及该沉淀用盐溶解后的含有目标产品的溶液直接进样到柱上, 当然也适用 7mol/盐酸胍或 8mol/L 脲的大肠杆菌表达蛋白提取液直接进样到柱上,在分离的同时也进行了复性。

层析方法	凝胶过滤层析	离子交换层析	疏水层析	亲和层析
分离机制	大小	电荷	疏水性	特异性亲
				和
选择性	中等	高	高 - 中等	非常高
载量	低	高	高	高
纯化速度	中等 - 低	高	高	高
生物相容性	非常好	好	中等 - 好	好
目标蛋白的得率	高	高	中等 - 高	高
捕获浓缩阶段	+	+ + +	+ + +	+ + +
中间纯化阶段	+	+ + +	+ + +	+ + +
精制纯化阶段	+ + +	+ + +	+	+ +

表 1: 常用层析方法对比

其他纯化方法

对于具有特殊性质的蛋白,可以利用特殊的方法对其进行纯化,下面就一些蛋白的特殊性质及纯化方法做一介绍。可逆性缔合:在某些溶液条件下,有一些酶能聚合成二聚体、四聚体等,而在另一种条件下则形成单体,如相继在这两种不同的条件下按大小就可以进行分级分离。

热稳定性:大多数蛋白质加热到 95℃时会解折叠或沉淀,利用这一性质,可容易地将一种经这样加热后仍保持其可溶性活性的蛋白质从大部分其它细胞蛋白质中分离开。

蛋白酶解稳定性:用蛋白酶处理上清液消化杂蛋白,可以纯化得到具有蛋白酶解抗性的蛋白质。

溶解度:影响蛋白质溶解度的外界因素很多,如溶液的 pH、离子强度、介电常数和温度等。在特定的外界条件下,不同的蛋白质具有不同的溶解度。适当改变外界条件,控制蛋白质混合物中某一成分的溶解度从而将其从溶液中析出。

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

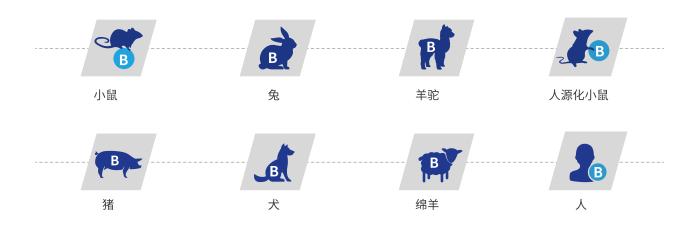


高通量,周期短,单抗发现快至29天

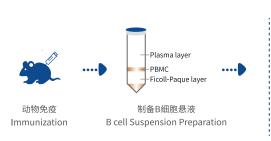


ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种



服务流程











BGE®高通量表达 BGE®HTP Expression



FACS Assay



Elisa 检测 Elisa Assay



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lgG、lgM。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





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。





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。

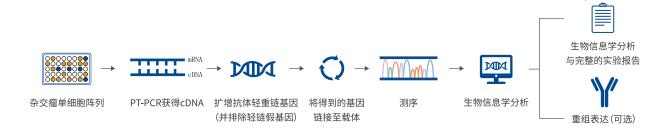
应用场景

- 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lgM和lgG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

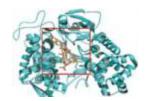


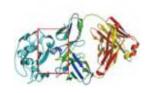


德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down,免疫共沉淀,酵母双杂交等相比,具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

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。



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



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当

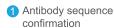


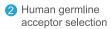
改造后的抗体人源化程度>90%



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

















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	

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