

蛋白表达中包涵体问题

外源基因在高效表达时常形成不可溶、无生物活性的包涵体，这在原核细胞特别是大肠杆菌中常见，在酵母、真核细胞也可以观察到，有些内源性蛋白质过高表达时也会形成包涵体。在原核蛋白表达纯化中目的蛋白经常发生错误的折叠，并聚集成为包涵体。经过诱导，目的蛋白通常可达细胞总蛋白的 50% 以上。虽然有一定比例的蛋白以可溶的单体形式存在，而多达 95%（甚至更多）的蛋白则在包涵体中。实验过程中，可以采取降低诱导温度，例如 25 - 30° C，或降低 IPTG 浓度(0.01 - 0.1mM)并延长诱导时间，还有采用特别的培养基等方法获得更多的可溶蛋白。

得到具有生物活性的重组蛋白质，需进行包涵体蛋白质的体外重折叠复性，以尽可能恢复其蛋白质的天然构象。因此，包涵体蛋白质的复性是重组蛋白质生产的关键技术之一，对于基因工程产品的产业化具有重要的学术价值。

包涵体的形成

包涵体形成的可能主要原因如下：

a. 外源基因表达蛋白的速率过快、浓度过高，生成的蛋白质没有足够的时间和空间折叠形成正确结构，蛋白在折叠过程中疏水区暴露于溶液中，分子间的相互作用形成错误折叠导致凝集使其蛋白难以达到足够的溶解度；

b. 发酵温度过高、胞内 pH 接近蛋白等电点 (pI)、某些金属离子等因素影响包涵体动力学的稳定；

c. 表达环境的细胞内部还原性过高，不能有效完成二硫键的氧化折叠，使蛋白质中二硫键稳定性下降，出现错配或多余的二硫键；

d. 原核系统缺乏一些蛋白质折叠过程所需的酶和辅助因子，如蛋白质二硫键异构酶 (PDI)、肽基脯氨酸顺反异构酶 (PPI)、分子伴侣 GroEl/GroES 等，未能有效辅助正确构象的形成，使其翻译后的蛋白质易暴露出疏水基团，从而引起蛋白质的聚集。

包涵体的复性

包涵体蛋白的成功复性需要经过两大步骤：包涵体洗涤溶解和包涵体复性

大肠杆菌培养液，经离心浓缩后，可用机械破碎、超声破碎显著提高包涵体的纯度和回收率；洗涤包涵体上粘附的杂质，如膜蛋白、核酸等；溶解一般用强的变性剂如尿素、盐酸胍，通过离子间的相互作用，打断包涵体蛋白质分子内和分子间的各种化学键，使多肽伸展。

常用的复行方法包括：稀释复性、透析复性、超滤复性、柱上复性

稀释复性直接加入水或缓冲液，放置过夜，缺点是体积增加较大，变性剂稀释速度太快，不易控制。

透析复性好处是不增加体积，通过逐渐降低外透液浓度来控制变性剂去除速度，但易形成无活性蛋白质聚体，且不适合大规模操作，无法应用到生产规模。

超滤复性在生产中较多的使用，规模较大，易于对透析速度进行控制，缺点是不适合样品量较少的情况，且有些蛋白可能在超滤过程中不可逆的变性。

相比稀释和透析两种方法，色谱柱复性回收率高，快速，易放大，样品稀释倍数小。

高蛋白质浓度下的复性通常有两种方法，一是缓慢地连续或不连续地将变性蛋白加入到复性缓冲液中，使得蛋白质在加入过程中或加入阶段之间有足够的时间进行折叠复性；二是采用温度跳跃式复性，即让蛋白质先在低温下折叠复性以减少蛋白质聚集的形成，当形成聚集体的中间体已经减少时，迅速提高温度以促进蛋白质折叠复性。

相关产品推荐

[天然蛋白](#) [重组蛋白](#) [小分子抗原抗体](#)

Order and Inquiry

You can place an order or Inquiry through the following methods, and we will contact you

ASAP:

QQ 499854788; 82458988

Email info@biotyscience.com

Tel 010-5365 2239

北京百欧泰生物科技有限公司

Tel: 010-5365 2239 Email: info@biotyscience.com

Address: 北京市房山区良乡凯旋大街建设路 18 号