****

昆虫细胞蛋白表达常见问题解析

****

**昆虫细胞蛋白表达常见问题解析**

**1、昆虫细胞蛋白表达系统能否将两个基因共同表达？**

答：昆虫细胞可以同时表达多个基因,杆状病毒衣壳内可以容纳较大的外源DNA插入片段，可以分别构建2个质粒，然后一起转染昆虫细胞，这种方式的优点是可以分别优化两个蛋白的表达水平，可以控制两个蛋白的表达平衡，相对于一个质粒共表达的方式缺点是在蛋白表达之前质粒构建，质粒抽提，蛋白病毒包被工作及成本费用都是增加一倍的；另一种共表达的方式是pFastBac Dual载体上构建两个目的基因，就可以同时表达两个蛋白。pFastBac Dual载体上两个启动子分别为PH和P10启动子，其中PH启动子蛋白表达效率要高于P10启动子。

**2、昆虫细胞蛋白表达系统的优势**

（1）、可以表达大分子量的蛋白，目前做过250KD蛋白表达，依然稳定性较好，没有断裂或降解。
（2）、昆虫细胞相对哺乳动物细胞培养相对简单，27度培养，无需CO2补充，目前商业化的培养基细胞培养非常成熟，细胞密度能够达到15\*10^6个/ml，[昆虫表达系统](http://www.zoonbio.com/service/protein-expression-bactobac-sf9.html)成本较哺乳表达系统较低。
（3）、病毒一次包被，长期使用，稳定表达。较哺乳瞬时表达系统而言，该系统放大表达较容易，不需要抽提大量的质粒，质粒的质量以及批次差异会影响蛋白表达。昆虫表达系统只需要包被好病毒，做好表达小试即可稳定放大表达。
（4）、昆虫细胞体系能进行翻译后的加工修饰，包括糖基化、磷酸化、酰基化、信号肽切除及肽段的切割和分解等；
（5）、可以同时表达多个基因，比如抗体、 fab、互相结合作用的蛋白等；
（6）、杆状病毒对脊椎动物无感染性。
（7）、可以表达有毒蛋白，比如抗菌肽。

**3、昆虫病毒的保存方式对病毒有怎样的影响？**

答：制备病毒时添加2%的细胞培养级别的BSA或者胎牛血清，有助于保护病毒，如果忘记添加，在收货病毒后添加，放在4度或者负80保存，短期使用（一般半年左右）可以放在4度，长期使用建议负80保存，再次使用建议检测一下病毒滴度或者做个表达小试，防止病毒滴度降低或失效。对于长期项目，放大项目也可以考虑制备BIIC,液氮保存。

**4、哪一类蛋白更适合昆虫表达系统？**

答：激酶、HDAC（组蛋白去乙酰化酶）、病毒/昆虫来源的蛋白、糖蛋白、细胞因子、衣壳蛋白、VLP、 包膜蛋白、膜蛋白。这些蛋白有的本身属于比较困难表达的蛋白，可以使用昆虫体系尝试表达。

**5、衣壳蛋白表达后，如何鉴定纯化， VLP是什么？**

答：衣壳蛋白纯化有些难度，主要会蛋白可溶性不好、不挂柱、形成聚体等问题，一般都是需要多步纯化的方式获得比较纯的蛋白。
VlP病毒类似颗粒，不含有核酸，有较强的免疫原性和生物活性，没有感染性，安全性高，所以适合开发疫苗。要想成功制备VLP需要考虑的工作比较多，在构建、纯化、鉴定、稳定性、活性以及规模化纯化都是需要努力的。
构建：对于非囊膜病毒而言，主要形成的VLP是其核衣壳蛋白，可以通过嵌合表达，为什么要做嵌合，对于一些病毒而言，一个病毒属或科里面的不同病毒他形成VLP的效率不一样，因此要借助那些组装效率高的VLP，来嵌合组装效率不高的病毒。再者是制备二联或二价疫苗。对于囊膜病毒而言，带有GPI锚定序列的外源蛋白，一旦表达后可以自动装配到细胞膜上面，再通过囊膜病毒自身的出芽，最终就在病毒囊膜上。
纯化：有的病毒纯化后用专用的缓冲液透析可以促进蛋白组装成VLP,有的病毒不能通过传统的纯化方式完成组装，可能这种纯化方式破坏了已经组装好的病毒。小量纯化有蔗糖密度梯度离心和氯化铯密度梯度离心的方式，能够有效的保护vlp结构。
电镜观察：需要处理样品，低盐、去蔗糖防止制备样片风干的时候有晶体影响染色效果。用钟鼎专用推荐的缓冲液可以减少蛋白聚集。染色时间不能太长。

**6、昆虫蛋白表达是用昆虫吗？**

答：不是，是通过培养昆虫细胞来表达蛋白的。也有用昆虫来表达蛋白的，比如家蚕，这个属于侵染昆虫，属于家蚕系统（BmNPV），家蚕表达蛋白能大量表达，但是家蚕表达蛋白后蛋白的纯化会非常困难，并且我们的家蚕的培养环境和技术也有限，所以我们不推荐家蚕来表达蛋白。

**7、目的蛋白表达后和病毒一起释放到胞外吗？**

答：目的蛋白是否释放到胞外主要由蛋白本身的性质决定以及是否添加信号肽决定，若目的蛋白在载体载体构建时加了信号肽，蛋白一般都会释放到胞外，但如果目的蛋白本身属于包内蛋白，如细胞骨架蛋白、核蛋白、胞质蛋白等，即便添加了信号肽，蛋白也可能不会释放到胞外。因此病毒的释放和目的蛋白的释放是两个过程，蛋白可能会和病毒一起释放到胞外，也可能会留在胞内。

**8、BIIC是什么意思，如何制备BIIC？**

BIIC:Baculovirus Infected Insect Cell
该技术被开发用于杆状病毒的长期储存，并且消除了对病毒扩增和重新滴定检测的需要。同时提高产量并减少批次之间的差异。主要是通过液氮冻存含有病毒的细胞来用于下游表达，据介绍该保存方法可以稳定保存病毒60个月不影响表达。

**9、目的基因是否是整合到昆虫细胞的基因中？**

答：不是，外源基因一般不会轻易的整合到宿主基因组中，需要有特定的条件，昆虫体系中，杆状病毒携带目的基因进入宿主，利用宿主的环境进行自我复制和基因表达，目的基因并没有整合到宿主基因组中。

**10、昆虫蛋白表达，目的蛋白大小是否有要求？**

答：一般蛋白大小在10kd-100kd适合任何表达体系， 110-250KD的大蛋白首选[昆虫表达系统](http://www.zoonbio.com/service/protein-expression-bactobac-sf9.html)。

**11、通过添加助融剂得到的溶解蛋白与通过低温优化表达得到的溶解性蛋白有什么区别？助溶剂会影响蛋白活性吗？**

答：助溶剂是比较温和的表面活性剂，是将本身不溶的蛋白变成溶解的蛋白。 低温优化表达得到的溶解蛋白，是通过条件优化表达出溶解的蛋白。
  助溶剂理论上对蛋白的活性影响很小，但是不确定助溶剂对蛋白的活性没有影响，主要看后续的实验是做什么，对蛋白的活性需求，如果担心助溶剂对蛋白的影响，可以更换体系表达或者尝试条件优化。
  事实上，蛋白活性影响因素本身就很多，从表达系统上说大肠活性＜昆虫＜哺乳，大肠很多时候表达的蛋白都没活性，昆虫是不保证活性，哺乳是大部分都是有活性的；从蛋白角度分析：有的蛋白本身就是可溶性差的蛋白，亲水性比较差，在表达的时候就容易沉，沉淀就基本上没有活性。有些蛋白表达出来本身就没有活性，不论加不加助溶剂，蛋白都不会有活性，因此是否添加助溶剂与蛋白有没有活性，不成对等的关系，但如果需要有活性的蛋白，最好能表达出溶解的蛋白，并且不需要加助溶剂。