# 蛋白制备三大坑！裂解/除杂×浓缩×标签融合技巧全解析

在研究蛋白互作的实验中，蛋白样本制备的质量对后续western blot或质谱分析影响颇深。

蛋白样本的制备质量，并不仅限于蛋白提取，后续可能需要进行的蛋白浓缩、标签蛋白纯化也是样本制备的关键操作，每一样都马虎不得。

**裂解除杂：打破细胞壁垒，提纯蛋白的**

**“清道夫”法则**

我们先从蛋白提取说起。传统的细胞样本提取蛋白，再到后续的western blot结果分析是比较简单的，但如果你的样本是表达重组蛋白的菌体，那么在使用RIPA裂解后，有时我们会发现裂解物比较黏稠，再接着往下做直到western blot结果出来后可能会看到一些莫名其妙的条带拖尾。

这时，我们的第一反应可能是：哎呀，样本要么有杂质要么降解了。

如果是杂质，那这杂质到底是啥？知其然才能确保下次不出问题。其实，这里可能是因为大量表达重组蛋白的菌体，在裂解后会释放出很多染色体DNA——这就是裂解物黏稠的来源，它在后续的电泳中影响蛋白移动，最终造成显影结果呈现拖尾。

我们可以通过3个小办法来改善：一是改用针对不同物种样品而优化配方的裂解液，其本质是优化了去污剂配方，让细胞裂解效率更高的同时保持生物活性，第二，在改善裂解液的基础上，配合超声同步处理样本，超声产生的剪切力可以切断染色体长链DNA；三是在裂解时再搭配核酸酶除核酸，通常核酸酶是需要单独加入的，有的核酸酶定向切割DNA，有的则不区分核酸种类，直接把核酸降解为几个bp长度的小片段。

**超滤浓缩：精准把控蛋白浓度，浓缩过程中的**

**“节流”与“开源”**

选择合适的样品除杂方法可以提高结果的质量。但有时蛋白少得可怜，别说杂质了，目的条带都不一定能看到——比如让当我们要研究分泌型的蛋白时。

研究分泌型蛋白，要从培养物上清获蛋白。细胞什么时间周期进行分泌？是否采用了合适的诱导方法促进分泌？有时，即便已经采用了合适的方法获得蛋白，但浓度却不一定能满足下游的IP分析。这时，就要考虑蛋白浓缩。

选择超滤浓缩还是冻干浓缩更合理？冻干浓缩的效果可能更好，但是冻干过程有可能造成蛋白的稳定性破坏，进而影响IP实验的抗体结合效率，而且冻干后的蛋白还需要考虑复溶的条件，操作复杂，还需要专门的设备。相比之下，通过超滤浓缩更适合处理分泌型蛋白含量低的问题。

超滤浓缩前，我们特别应该关注2个细节：样品前处理和选择合适的超滤管。

第一，应该先通过4℃，10,000×g离心去除上清中的大体积杂质和细胞碎片。

第二，选择合适的超滤管，这里的合适不仅包括截留分子量，还包括了滤膜材质。截留分子量大小应该约为如果我们研究的蛋白大小的1/3甚至更低，比如30 kDa的蛋白，就应该选择10 kDa的超滤管。而滤膜材质的选择，更多的应该从化学兼容性以及对蛋白吸附效果两点出发考虑。这里建议同学们通过产品说明书上提供的化学兼容性表查询确认即可，而对于分泌型蛋白，应该首选低蛋白吸附的再生纤维素膜材质的超滤管，这样可以避免本就少得可怜的蛋白的二次流失。

**标签融合表达：给蛋白装上“导航仪”，**

**让分离纯化事半功倍**

如果你的研究特别超前或小众——比如要做Co-IP却发现待测蛋白居然找不到合适的商用抗体。那么，接下来的样本制备思路可能对你有启发。

首先，我们必须意识到，Co-IP下游检测不一定依赖Western blot实验技术，蛋白互作沉淀后通过SDS-PAGE电泳分离条带，再利用LC-MS/MS分析互作蛋白，也可以确认待测蛋白信息。这个过程不需要抗体，它主要依赖足够的蛋白量以及可供燃烧的实验室经费。

另外一种思路则是构建标签表达载体，将待测蛋白的基因克隆到含有标签的表达载体中，转染至目标细胞，并过表达带上标签的待测蛋白。进入Co-IP阶段后，用已知蛋白的IP抗体来做免疫沉淀，Western blot阶段再使用标签抗体检测目标蛋白。

通过融合标签实现间接检测是一种比较经济的做法，我们需要关注的点主要是实验设计，包括：选择合适的标签和设计合理对照。

常见的标签有FLAG、GST、His、Myc、HA等，如果下游实验是Co-IP/IP，建议大家优先考虑FLAG标签，因为FLAG标签较短、对蛋白空间构象的影响较小，——尽量降低外部标签对蛋白的折叠、活性以及相互作用的干扰。

其次，就是设计合理对照，因为过表达带标签的待测蛋白后，细胞可能无法完成大量外源蛋白的正确折叠，导致蛋白出现异常聚集，这些异常的蛋白就可能无法参与蛋白互作。因此，控制转染的质粒总量、设置多个转染梯度的对照实验是有必要的。