

His融合蛋白纯化中常见问题解答集锦(一)

GE Healthcare 产品专家: 朱燕、苗景贺

His-tag是专门设计用于重组蛋白质的纯化, 与其他标签相比有很多明显优势, 是目前用于纯化的融合标签中使用最为广泛的一种, 这里我们就列举几个HIS标签蛋白纯化的中常见的问题来讨论。

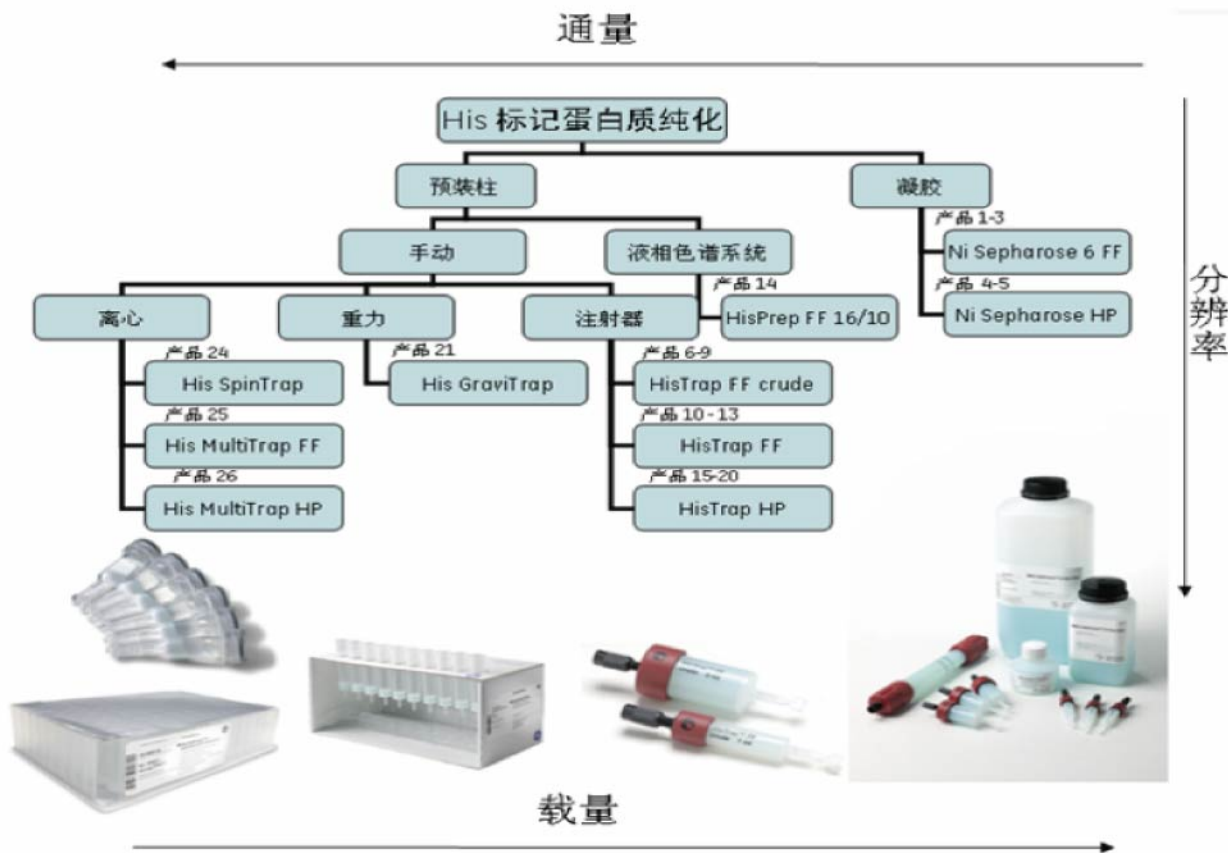


图1. His产品的选择

对于HIS标签蛋白纯化的产品, 如何选择?

我公司为纯化组氨酸标记的蛋白质提供了全面的解决方案, 产品种类丰富应用广泛(见图1), 下面一一介绍其特点和应用。

Ni Sepharose High Performance

用于高分辨率纯化的预带电荷的介质 Ni Sepharose High Performance, 通过耦联Ni使介质预带电荷, 使用非常方便。和其它厂家的同类产品比较, 它具有高载量和低的Ni脱落的特点, 低的镍脱落保证的HIS-标记的蛋白质在多次重复的纯化中保持可靠的载量。同时Ni Sepharose High Performance填料的颗粒大小只有34um, 具备最高的分辨率和最低的样品稀释。Ni Sepharose High Performance除了有散装填料形式, 也具有HISTrap1MI和5MI的实验室预装柱, 可以连接AKTA仪器, 蠕动本以及手动注射器操作, 使用非常方便。



His MultiTrap HP 96孔过滤板

用于高通量筛选和多样品的平行纯化, 预装了Ni Sepharose High Performance的填料, 未澄清的细胞裂解液可以直接上样, 具有高重复性, 操作简单方便快捷的特点。

His SpinTrap柱

用于少量的蛋白质制备, 预装了100ul的HP填料, 可以直接上澄清和未澄清的样品, 可用于细菌细胞裂解液的筛选和优化纯化条件, 与标准离心机使用, 一次纯化仅需10分钟。



Ni Sepharose6 Fast Flow

高度交联的琼脂糖的高流速性质, 使其成为批次纯化、蛋白制备和放大生产的首选介质。Ni Sepharose6 Fast Flow填料具有非常高的载量, 意味着纯化同样的蛋白所用的介质就更少, 成本就更低。和其它厂家的同类产品比较, 它具有高

载量和低的Ni脱落的特点,低的镍脱落保证的His-标记的蛋白质在多次重复的纯化中保持可靠的载量。同样具有高载量和低的Ni脱落的特点。同样有HisTrap FF预装柱和His MultiTrap FF96孔板的形式,方便不同目的的纯化。

His Trap FF crude预装柱

从未澄清的细胞裂解液中直

接纯化目标蛋白质HisTrap FF crude 1 ml和5 ml内预装了Ni Sepharose 6 FF, 可以直接上样未澄清的细胞裂解液, 这样减少样品制备时间, 加快纯化速度, 使在有蛋白酶存在的细胞裂解液中敏感的目标蛋白质的降解可能性降到降到最小。



His GraviTrap

简单的纯化和

快速得到结果

His GraviTrap是预装了Ni Sepharose 6 FF一次性使用的柱子。柱子可以用重力不需要系统快速简单的纯化, 澄清的和未澄清的大体积的样品可以一次性上样, 一次纯化的时间大约在30分钟(根据样品的体积和黏度) HisGraviTrap包含在HisGraviTrap的Kit中, 其中包含了优化过的, 可供20次纯化使用的缓冲液。



His Buffer Kit——方便添加的预制好的缓冲液

Kit含有结合、清洗和洗脱的浓缩缓冲液, 适合于Ni Sepharose和IMAC Sepharose产品, 节省了耗时的缓冲液配置时间, 加快纯化目标蛋白质

纯化的组分中没有His标签的蛋白?

经常我们的客户反馈没有纯化到His标签蛋白, 不要着急, 我们——来排除可能的原因, 首先确定是蛋白没有挂上柱子都流穿了, 还是蛋白没有被洗脱下来, 然后——检查原因:

若His标签蛋白没有结合上去都流穿了, 请依次检查:

- **可能原因:** 超声的功率不对(太大, 蛋白炭化, 太小, 蛋白没有释放)
策略: 改变超声功率, 并在超声前加入溶菌酶
- **可能原因:** 样品或者是结合缓冲液不正确:
策略: 检测pH 及样品和结合缓冲液的组成份。确保在溶液 中螯合剂或强还原剂的浓度及咪唑的浓度不是太高。
- **可能原因:** 组氨酸的标签没有完全的暴露
策略: 在变性条件下(用4-8 M 脲, 或4-6 M 盐酸胍)进行纯化。

• **可能原因:** HIS标签丢失,

策略1: WB或者anti-his的抗体检查His是否表达, 上游构建, 改变his-tag的位置(C-terminal or N-terminal), 必要时增加his个数(常用6-10个)。

策略2: 孵育的时间不够, 降低流速和增加孵育的时间。

策略3: 改变螯合的金属离子, 寻找到最佳的结合金属离子。

Ni²⁺通常是从宿主细胞蛋白中纯化大多数(组氨酸)6 标记的重组蛋白质的首选金属离子。也是一般最常用的离子。蛋白和金属离子之间的结合强度受几种因素影响, 包括长度、位置、亲和标记在蛋白的暴露程度、所用离子的类型、以及缓冲液的pH, 因此一些蛋白用其他离子可能更容易地进行纯化而不用Ni²⁺。可以利用Hitrap IMACHP来筛选不同的金属离子, 具体应用实例请参考《Recombinant Protein Purification Handbook》, 或者登录www.gelifesciences.com.cn查询。

若没有洗脱下来, 请依次检查:

- **可能原因:** 洗脱条件太温和(组氨酸标记的蛋白质仍然结合在柱上, 结合力较强)
策略: 用增加咪唑的梯度洗脱或降低pH 来找出最佳的洗脱条件。
- **可能原因:** 降低PH的方法洗脱的, 因为若PH低于3.5, 会导致镍离子脱落
策略: 改变洗脱办法, 咪唑竞争性洗脱
- **可能原因:** 蛋白已沉淀在柱上
策略: 减少上样量, 或使用咪唑的线性梯度而不是分步洗脱以降低蛋白的浓度。试用去污剂或改变NaCl 的浓度, 或在变性条件(去折叠)下洗脱(用4-8 M 脲, 或4-6 M 盐酸胍)。
- **可能原因:** 非特异性疏水或其他相互反应
策略: 加非离子去污剂到洗脱缓冲液(如, 2% Triton X-100) 或增加NaCl 的浓度。

HIS标签蛋白洗脱后杂带较多, 什么原因? 如何优化?

高纯度的蛋白是纯化工作者的追求, 但是由于很多天然的蛋白也会带有HIS, 所以经常会出现HIS标签蛋白洗脱后有一些杂带, 可能的原因和优化的方法如下:

- **可能原因：**蛋白酶部分降解了标签蛋白。
策略：请添加蛋白酶抑制剂，(慎用EDTA)。
- **可能原因：**杂质对镍离子有更高的亲和力。
策略1：咪唑浓度必须优化，以确保高纯度(宿主细胞蛋白质的低结合)和高产率(组氨酸标记的目标蛋白质的强结合)之间的最佳平衡。

分步或者线性洗脱摸索出最优的咪唑结合和清洗浓度；在样品中加入与结合缓冲液同样浓度的咪唑；咪唑的梯度不大(20个或更多的柱床体积)，可能分离出有相似结合强度的蛋白。应用实例可以参考《生命科学园》2006年8月第23期

策略2：筛选最适合的缓冲液条件，NaCl浓度，PH的范围都需要进行筛选

以下是(His)₆-NuRR1蛋白在His MultiTrapFF96孔板上进行缓冲液条件的筛选以便决定最适的结合和洗脱条件。对于单一目标蛋白在进行缓冲液筛选时，将缓冲液、盐、甘油和还原剂设计成96个不同的混合配方。实验结果显示对于该目标蛋白在25mM Tris, 10mM NaCl, 10%甘油, PH8.5的缓冲液适最佳的结合条件。详细的实验方法流程请参考生命科学园2007年8月25期(参见图片2)。

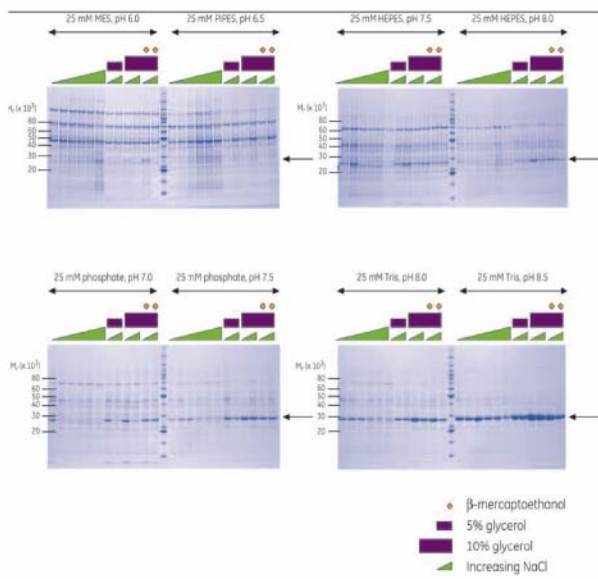


图2

策略3：若以上优化的条件都不能去除杂质蛋白，需要考虑多步纯化的思路，离子交换(HiTrap Q HP or HiTrap SPHP)和凝胶过滤(Superdex™ Peptide, Superdex 75 or Superdex200)是必须的。以下是用ÄKTAexpress仪器进行四步纯化的实例。AC(亲和), DS(脱盐), IEX(离子交换), GF(凝胶过滤)所有的步骤都在ÄKTAexpress上自动执行,包括柱上的标签酶切。(参见图片3)文章出处《Recombinant Protein Purification Handbook》

Columns: AC: HiTrap HR, 5 ml
DS: HiPrep 24/10 Desalting
IEX: RESOURCE™ Q, 6 ml
GF: HiLoad 16/60 Superdex 75 pg
APC234, M, 32 000 kDa cleaved product, M, 30 000

Sample: 200 units of ActEV™ protease/mg protein, 8 h incubation time at room temperature

Cleavage conditions: AC binding buffer: 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.5
AC cleavage buffer: 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 50 mM imidazole, pH 7.5
AC elution buffer: 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 7.5
DS and IEX binding buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0
IEX elution buffer: 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 8.0
GF buffer: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5

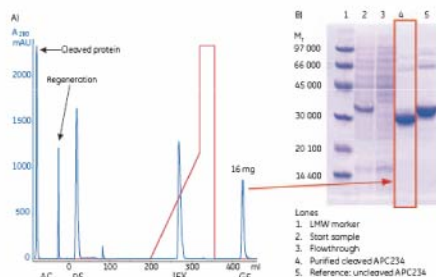


Fig 4A. (A) Four-step protocol for purification of (histidine)₆-tagged protein cleaved with ActEV protease. (B) Analysis of the cleaved purified protein using SDS-PAGE. The gel was stained with Coomassie.

图3

- **可能原因：**杂质和标签蛋白结合在一起
策略：在超声破碎细胞之前加入去垢剂或者还原剂；增加去垢剂的浓度，(2% Triton X-100 or 2% Tween 20)；或者在wash buffer中增加甘油的浓度(50%)减少非特异性的相互反应；考虑增加咪唑的浓度或者改变金属离子。
- **可能原因：**洗涤不充分
策略：增加洗涤的次数,使洗涤充分。

以上是针对我们客户在使用产品过程中经常出现的问题进行讨论分析。未完待续，同时欢迎大家登录AKTAclub用户俱乐部论坛加入讨论(www.ebiotraole.com/amershambbs)