

# 利用His MultiTrap FF 96孔过滤板筛选最适缓冲液条件并在ÄKTExpress放大纯化His-标记蛋白

R. Steele and B. L. Grasberger  
Johnson & t Johnson, Exton, PA, USA

(His)6-NuRR 1蛋白在His MultiTrap FF 96孔过滤板上进行缓冲液条件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。实验结果展示对于该目标蛋白在25mM Tris, 100mM NaCl, 10%甘油, pH8.5的缓冲液条件下是最佳的结合条件。使用这个最佳的结合条件和两步纯化策略在ÄKTExpress上放大纯化目标蛋白。放大纯化展现目标蛋白形成了单体, 二聚体和三聚体。

## 引言

His MultiTrap FF 96孔过滤板常用于快速筛选和迅速平衡纯化His-标记的目标蛋白。在每一个孔中都预先填充了Ni-Sepharose 6 Fast Flow。该填料预先偶联了Ni<sup>2+</sup>离子便于结合His-标记的目标蛋白。本实验的一个目的是筛选(His)6-NuRR 1蛋白最适合的结合缓冲液和洗脱条件; 另一个目的是使用筛选出的最佳缓冲液条件在ÄKTExpress放大纯化His-标记蛋白。

## 在His MultiTrap FF上进行缓冲液筛选

在His MultiTrap FF上进行筛选的样品缓冲液条件如图1所示。缓冲液中NaCl浓度从100到750 mM, pH的范围从6.0到8.5, 甘油(5%到10%), 0.05%的还原剂, β 巯基乙醇也包含在样品缓冲液中。(Fig1)

缓冲液筛选是由TECAN™ Freedom EVO™ 200系统全自动的操作完成。

E. coli中表达的(His)6-NuRR 1蛋白被悬浮在两倍浓度的缓冲液中, 样品经过酶解破碎细胞, 细胞碎片经离心除去, 保留澄清的上清液。将上清液转移到His MultiTrap FF 96孔板通常保温10分钟, 之后将未结合的蛋白经过离心后收集。His MultiTrap FF 96孔板用包含50 mM的咪唑缓冲液清洗, 目标蛋白使用包含500 mM的咪唑缓冲液清洗。

在较低的pH下, (His)6-NuRR 1蛋白的结合较弱。许多非特异的宿主菌天然蛋白结合较多。在较高的pH条件下, 当甘油的浓度增加到蛋白结合量时, (His)6-NuRR 1蛋白的结合依赖于缓冲液中NaCl的浓度。增加NaCl的浓度, 样品的结合等比例减少。对于纯化(His)6-NuRR 1蛋白最适的缓冲液配比是25mM Tris, 100mM NaCl, 10% 甘油, pH 8.5(Fig 1)。

96孔过滤板: His MultiTrap FF  
 样品: E.coli表达的(His)6-NuRR 1蛋白  
 破碎/结合缓冲液: 缓冲液配比矩阵中含有1X BugBuster™ 蛋白提取剂,  
 25U/ml Benzonase™ 核酸酶,  
 1 kU/ml rLysozyme™ 溶液  
 2X完全蛋白酶抑制剂  
 Cocktail Tablet溶液  
 清洗溶液: 缓冲液配比矩阵中含有50mM咪唑  
 洗脱溶液: 缓冲液配比矩阵中含有500mM咪唑  
 SDS-PADE: 4到12% SDS梯度

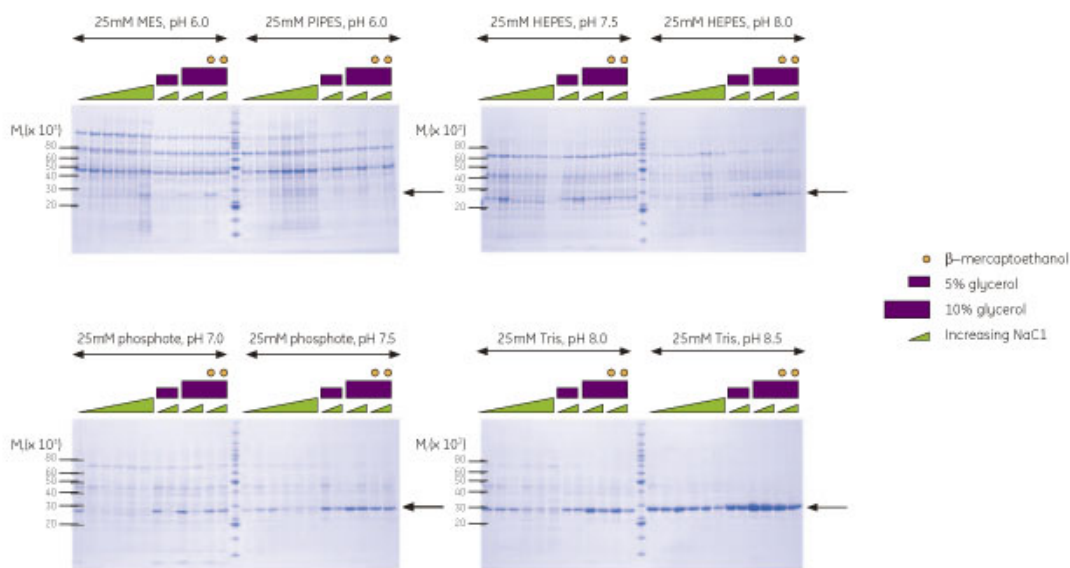


Fig 1. SDS-PAGE of the (His)6-NuRR1 purified with 96 different buffer conditions on His MultiTrap FF. Arrows indicate the target protein.

## 使用ÄKTExpress全自动进行(His)6-NuRR 1蛋白的两步纯化

在纯化前,表达的(His)6-NuRR 1蛋白的E.coli细胞被破碎缓冲液匀浆。破碎,结合,洗脱都使用25mM Tris, 100mM NaCl, 10%甘油, pH 8.5缓冲液,它是结合和洗脱的最佳缓冲液。在结合和洗脱时,咪唑被加到基础缓冲液中(参照Fig2中缓冲液条件)。

在ÄKTExpress上全自动进行纯化时,非澄清的E.coli细胞碎片直接上样到1 ml HisTrap™ FF Crude 柱上,目标蛋白通过与柱上固定金属离子的专一结合可直接纯化。纯化结果展示在该条件下(His)6-NuRR 1蛋白是一个单体,二聚体和三聚体的混合物(Fig2)。进一步的精细纯化使用HiLoad 16/60 Superdex 200pd凝胶过滤柱。收集的样品经SDS-PAGE后说明在ÄKTExpress上纯化的样品纯度很高。

### • 层析柱:

HisTrap™ FF Crude 柱 1 ml

凝胶过滤HiLoad 16/60 Superdex 200

### • 样品:

非澄清的E.coli表达液

(His)6-NuRR 1蛋白

### • 裂解缓冲液:

25mM Tris, 100mM NaCl,

10%甘油, pH8.5

1mM TCEP, 20mM咪唑

25U/ml Benzonase 核酸酶

1kU/ml r-赖氨酸酶溶液和2x全酶抑制剂

Cocktail Tablet溶液

### • IMAC结合清洗溶液:

25mM Tris, 100mM NaCl,

10%甘油, pH8.5

1mM TCEP, 20mM咪唑

### • IMAC洗脱溶液:

25mM Tris, 100mM NaCl,

10%甘油, pH8.5

1mM TCEP, 500mM咪唑

### • 凝胶过滤溶液:

25mM Tris, 200mM NaCl,

5%甘油, 1mM TCEP, pH8.5

### • 系统:

ÄKTExpress

## 结论

使用His MultiTrap FF 96孔过滤板可非常容易获得最适的缓冲液条件。对于(His)6-NuRR 1蛋白最适的缓冲液条件是25mM Tris, 100mM NaCl, 10%甘油, pH8.5。将这一最适缓冲液条件应用到ÄKTExpress上放大纯化。在放大纯化时,将IMAC和凝胶过滤有机结合,成功地获得了三种形式的(His)6-NuRR 1纯蛋白。

需要更多His MultiTrap FF的信息  
请访问[www.gehealthcare.com/his](http://www.gehealthcare.com/his)

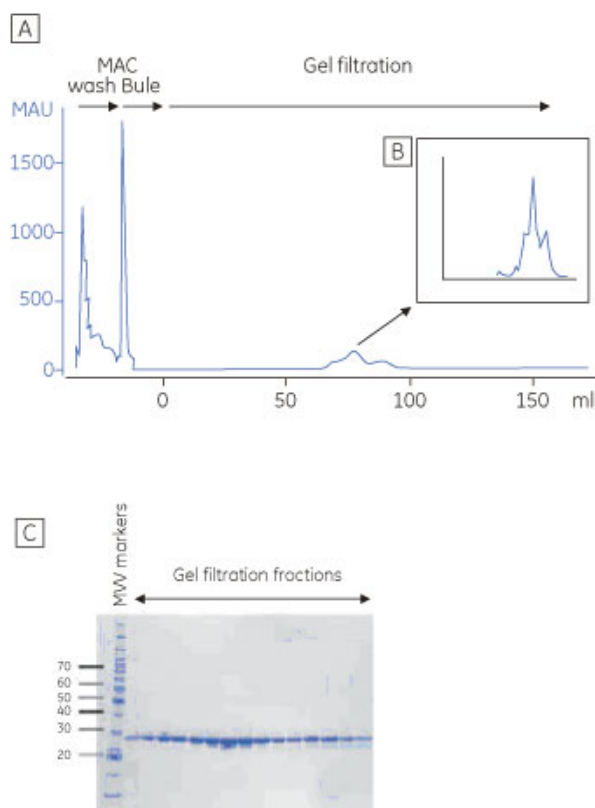


Fig 2. (A). Purification of (His)<sub>6</sub>-NURR1 by automated IMAC and gel filtration on ÄKTExpress. (B) Enlargement of the gel filtration peak shows the three isoforms of the target protein resulting from the purification. (C) SDS-PAGE of gel filtration fractions shows the high purity of the (His)<sub>6</sub>-NURR1 protein obtained from the purification.