

## His 标签蛋白纯化琼脂糖凝胶

### 产品描述

His 标签蛋白纯化琼脂糖凝胶是由高度交联的 4%琼脂糖凝胶为基质，用于纯化各种表达系统融合表达的 His 重组蛋白。

### 产品特点

基质	高度交联的 4%琼脂糖微球
载量	>40 mg 6xHis蛋白
粒径	45-165 $\mu$ m
储存&稳定性	2-8 $^{\circ}$ C 储存 24 个月
储存缓冲液	20% 乙醇
体积	10mL (5mL 凝胶)

### 纯化步骤

#### 1. 准备 buffer

平衡缓冲液：50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，300 mM NaCl，用 NaOH 调 pH 为 8.0

洗涤液：50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，300 mM NaCl，10 mM 咪唑，用 NaOH 调 pH 为 8.0

洗脱缓冲液：50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，300 mM NaCl，250 mM 咪唑，用 NaOH 调 pH 为 8.0

所用水和 Buffer 在使用之前建议用 0.22 $\mu$ m 或 0.45 $\mu$ m 滤膜过滤。减少杂质，提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

#### 2. 样品准备

##### 以大肠杆菌表达系统为例

- 1). 4 $^{\circ}$ C 离心 30 分钟 (4000 g) 收集菌体，弃上清。
- 2). 用冷平衡缓冲液重悬细胞，如果需要，可加入适量的添加剂，如蛋白酶抑制剂 (PMSF) 或其他蛋白酶抑制剂等。

**注意：**加入的抑制剂不能对 Ni-IDA 亲和层析介质的性能有影响，破碎液中不能含有 EDTA、EGTA 等螯合剂，DTT、巯基乙醇等还原剂，尿素、盐酸胍等变性剂。

- 3). 用超声波破碎法在冰上破碎菌体，直到样品破碎完全。

**可选：**如果裂解物太粘稠，可以加入 RNase A (终浓度 10  $\mu$ g/ml) 和 DNase I (终浓度 5  $\mu$ g/ml) 并在冰上孵育 10-15 分钟。

- 4). 4 $^{\circ}$ C 离心 20 分钟 (12,000 g)，除菌过滤，并小心将上清和沉淀分离。

- 5). 用 SDS-PAGE 分析 His 融合蛋白的含量及可溶性。

#### 3. 纯化重组 His 融合蛋白

- 1). 轻轻重悬 His 琼脂糖凝胶。

- 2). 吸取适量的 His 琼脂糖凝胶至重力柱中，用 5-10 倍柱体积的冷平衡缓冲液平衡 His 琼脂糖凝胶。

- 3). 将制备好的含有 His 融合蛋白澄清菌液加入到层析柱中，流速控制为 0.5-1 ml/min，

- 4). 裂解菌液全部流出层析柱后就立刻加入洗涤液清洗层析柱，所需量大约为柱体积的 10-20 倍或者直到流出液的 A280 值达到最低且稳定；

- 5). 用 5-10 倍柱体积的洗脱缓冲液以 0.5-1 ml/分钟的流速洗脱，收集洗脱液。或者根据流出液 A280 值判断，当数值陡然上升时开始接收洗脱液，直到 A280 数值降至最低且稳定停止收集。根据目的蛋白的性质和用途选择透析到 20 mM Tris-HCl，pH 8.0 或者 1  $\times$  PBS，pH 7.4 中。

#### 4. 树脂再生及储存

- 1). His 标签蛋白纯化产品可以重复使用而无需再生，但随着使用次数较多，非特异性结合的蛋白增多和蛋白的聚集，往往造成流速和结合载量都下降，这时需要对树脂进行清洗。

按照下面操作流程进行镍离子剥离和重新挂镍离子。

- 1) 使用 5 倍柱体积去离子水清洗填料；
- 2) 使用 5 倍柱体积 100 mM EDTA (pH 8.0) 剥落镍离子；
- 3) 使用 10 倍柱体积去离子水清洗填料；
- 4) 使用 5 倍柱体积 0.5M NaOH 清洗，
- 5) 使用 10 倍柱体积去离子水清洗填料；
- 6) 使用 3-5 倍柱体积 100 mM NiSO<sub>4</sub> 再生挂镍；
- 7) 使用 10 倍柱体积去离子水清洗；

填料再生后，可以立即使用，如不立即使用，需要将填料悬浮于等体积的 20%乙醇中，置于 4-30 $^{\circ}$ C 保存。

## 5. 可能遇到的问题及解决办法

问题	原因	解决方案	
洗脱组分中没有目的蛋白	蛋白可能是包涵体，上清无蛋白	可以通过电泳检测裂解液分析上清中是否含有目的蛋白，包涵体蛋白需要按照包涵体蛋白的纯化方式。	
	表达量太低	优化表达条件	
	目的蛋白结合比较弱，在洗杂步骤被洗下来了	提高 wash Buffer 的 pH，或者降低咪唑浓度。	
	融合蛋白被蛋白酶降解	在裂解步骤或洗涤步骤加入适量的蛋白酶抑制剂，如 PMSF。	
	融合蛋白不能有效地从树脂上洗脱下来	降低 Elution Buffer 的 pH 值，或者增加 Elution Buffer 中咪唑浓度	使用 10-100mM EDTA 溶液剥离镍离子，同时得到目的蛋白
回收的重组蛋白不纯	洗杂不彻底	增加 Wash Buffer 体积。	
	样品中含有其他的组氨酸标签蛋白	通过调节 pH 值，或者咪唑浓度来优化洗杂条件。然后通过使用其他的纯化方式（如离子交换，疏水等）进一步纯化洗脱组分。	

问题	原因	解决方案
上样过程中蛋白发生沉淀	浓度太大	适当稀释蛋白
	操作温度太低	室温下进行上样。
	蛋白发生聚集	在样品和所有的缓冲液中添加稳定剂，如 0.1% 的 Triton X-100 或者 Tween-20。