

His 标签重组蛋白纯化操作步骤

一、 材料准备

预装柱：HisTrap HP 预装柱（Cytiva）或 HisTrap FF 预装柱（Cytiva）

填料：Ni Sepharose 6FF 填料（Cytiva）；

缓冲液：磷酸钠（磷酸氢二钠和磷酸二氢钠按照一定比例混合。推荐爱必信，货号 abs47050025 和 abs47052107）；氯化钠（推荐爱必信，货号 abs47052148）；咪唑（推荐爱必信，货号 abs42019740）；

重力空柱（Cytiva）；

二、 实验步骤

（一）HisTrap HP 预装柱使用说明

结合缓冲液：20mM 磷酸钠缓冲液，0.5M 氯化钠，20-40mM 咪唑，PH7.4

洗脱缓冲液：20mM 磷酸钠缓冲液，0.5M 氯化钠，500mM 咪唑，PH7.4

缓冲液需要预先过滤和超声去除气泡。

- 1、系统设置一个低流速，移除预装柱顶部的堵头，把柱子连接到 ÄKTA 纯化仪的接头上，注意要液滴对液滴进行连接，防止引入气泡。
- 2、去除柱子底部的堵头，连接到纯化仪上。
- 3、用 3-5 个柱体积的蒸馏水洗去乙醇。
- 4、用 5 个柱体积的结合缓冲液平衡柱子，建议流速是 1ml/min（1ml 体积柱子）和 5ml/min（5ml 体积柱子）。
- 5、用上样环或者 superloop 加入预处理的样品（样品在上柱前一定要进行离心和过滤），在上样时建议流速为 0.2-1ml/min（1ml 体积柱子）和 0.5-5ml/min（5ml 体积柱子）。
- 6、用结合缓冲液洗涤至少 10 到 15 个柱体积，直到吸收峰达到稳定基线或在流出物中没有物质流出。洗涤过程中建议保持流速为 1-2ml/min（1ml 体积柱子）和 5-10ml/min（5ml 体积柱子）。
- 7、用洗脱缓冲液采用一步洗脱或者线性梯度洗脱（拉咪唑浓度梯度）。一步洗脱通常 5 个

柱体积，线性洗脱通常 10-20 个柱体积。在洗脱过程中保持流速为 1-2ml/min（1ml 体积柱子）和 5-10ml/min（5ml 体积柱子）。

8、洗脱后，用 3-5 个柱体积的结合缓冲液洗涤柱子，然后加入 20%乙醇。拧上柱子上下堵头，防止柱子变干。

Note：如果需要去除纯化后样品中的咪唑，建议使用 HiTrap Desalting 脱盐柱（货号 29048684,17140801）或者 PD-10 Dealtling 脱盐柱（货号 17085101）。



（二）Ni Sepharose 6 FF 装重力柱使用说明

结合缓冲液： 20mM 磷酸钠缓冲液， 0.5M 氯化钠， 20-40mM 咪唑， PH7.4

洗脱缓冲液： 20mM 磷酸钠缓冲液， 0.5M 氯化钠， 500mM 咪唑， PH7.4

缓冲液需要预先过滤和超声去除气泡。

一、 准备 PD-10 空柱（货号 17043501）

- 1、 用 20%的乙醇洗涤滤膜。
- 2、 用蒸馏水润洗滤膜。
- 3、 将滤膜放入 PD-10 空柱。

二、 填料准备

- 1、 轻柔震荡瓶子，直到填料悬浊液均一。
- 2、 将需要量的填料悬浊液从瓶中转移到离心管中。
- 3、 用 500xg 离心 5min 以沉淀填料。
- 4、 除去上清，加入适量蒸馏水。
- 5、 轻柔的振荡填料悬浊液 3min， 用 500xg 离心 5min。
- 6、 除去上清，加入适量结合缓冲液，重复步骤 5。
- 7、 把填料悬浊液转移到量筒中。
- 8、 加入适量体积的结合缓冲液，使悬浊液中的填料浓度达到 50%。

三、 重力柱纯化

- 1、 将样品加入含有 50%填料的悬浊液中（样品在上柱前要进行离心和过滤）。Ni Sepharose 6FF 的平均载量是 40mg/ml。则 1ml 的 50%悬浊液的载量为大约 20mg 蛋白。
- 2、 将样品和填料混合物在摇床上低速混合 1h。
- 3、 将样品和填料混合物加入到 PD-10 的空柱中，收集流出物。
- 4、 用结合缓冲液洗涤 2-5 个柱体积，收集流出物。
- 5、 用 4 个柱体积的洗脱缓冲液洗脱，收集流出物。

三、Ni 柱的使用与保养

1. 对于一般的预装柱（Crude 系列除外），上样前样品需要使用 $0.22\ \mu\text{m}/0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜进行过滤和离心处理，以避免样品中有细胞碎片等固体物质，堵塞柱子。
2. 如果细胞裂解后非常粘稠，需考虑是否因为 DNA、RNA 这类核酸物质过多，需要加入核酸酶去除，以降低样品粘稠度，提高上样速度及洗脱效果。
3. 柱子使用过程中，不能超过填料的压力，以免填料被压塌。
4. 每次使用后，可使用 5-10 个柱体积的去离子水或者结合缓冲溶液对柱子进行清洗。（如果出现载量严重下降或者压力增加，需考虑彻底清洗）

CIP（彻底清洗）

Cytiva 的纯化柱是可以重复使用的，通常情况下不用每次使用都进行 CIP。常规柱子（除了 HisTrap excel）如出现反压严重升高或者柱子明显颜色改变，说明柱子需要进行彻底的清洗。（HisTrap excel 可直接使用 NaOH 清洗）

1. 脱镍：

(1) 脱镍缓冲液：20mM 磷酸钠缓冲液，0.5M NaCl，50mM EDTA，pH 7.4。

(2) 使用 5-10 个柱体积的脱镍缓冲液冲洗柱子。

(3) 使用 5-10 个柱体积的结合缓冲液冲洗柱子。

(4) 使用 5-10 个柱体积的蒸馏水冲洗柱子。

2. 柱子清洗

(1) 去除沉淀蛋白、疏水性蛋白及脂蛋白：将柱子置换到 1M NaOH 中，室温 1-2 小时（若需要去除内毒素可延长至 12 小时），再用 5-10 个柱体积去离子水冲洗。

(2) 去除强离子吸附蛋白：使用 1.5M NaCl 洗柱子，约 10-15 分钟，然后用大约 10 个柱体积去离子水冲洗。

(3) 去除疏水结合蛋白，脂蛋白，油脂：用 5-10 柱体积 30%的异丙醇清洗 15-20min，然后用大约 10 个柱体积去离子水清洗。或者使用 2 个柱体积去垢剂清洗 1-2 小时，然后用至少 5 个柱体积 70%乙醇冲洗去除残留的去垢剂，然后用大约 10 个柱体积去离子水冲洗。

3. 挂镍：加入 0.5ml（1ml 柱子）或者 2.5ml（5ml 柱子）0.1M 的 NiSO_4 ，使用 5 个柱体积的去离子水冲洗，再用结合缓冲液冲洗 5 个柱体积，最后置换到 20%乙醇中保存

四、常见问题

问题 1：裂解液的粘性较高

回答：如果裂解液因为宿主核酸浓度高而粘性较高，可以连续超声直到粘性降低，或者加入 5 $\mu\text{g/ml}$ 的 DNase I，1mM 的 Mg 离子，在冰上孵育 10 到 15 min。

问题 2：目的蛋白不挂柱或在洗脱前出现

回答：

1. 缓冲液或者样品的成分不合适：检查缓冲液中的添加剂的浓度，不宜含有较高的金属离子螯合剂，强还原剂和咪唑的浓度（如 EDTA 或者 DTT）。同时优化缓冲液的 PH，盐离子浓度，添加剂。确定缓冲液或者样品中的添加剂的成分和浓度，不能超过柱子的耐受性（耐受性参见说明书）。
2. His 标签被部分阻碍：在变性的条件下洗脱（使用 4-8M 的尿素或者 4-6M 的盐酸胍），或者改变 His 标签的位置或增加组氨酸数目。
3. 检测 His 标签是否存在：大肠杆菌外源蛋白表达过程中，有时候会出现序列丢失的现象，如果标签丢失，蛋白自然就无法挂柱了，检测 His 标签可以使用 His 抗体通过用 Western-Blot 方法检测。
4. 样品超过了柱子的载量：可以把几个 HisTrap 柱串联使用。
5. 纯化时蛋白和柱子接触时间过短：可以适当延长蛋白和柱子的接触时间。
6. 超声功率不对：改变超声功率，同时可以在超声前加入溶菌酶。
7. 在样本或者 binding buffer 中咪唑的浓度太高：蛋白可能会在流穿液中被发现，降低咪唑的浓度。

问题 3：目的蛋白挂柱后洗脱不下来

1. 洗脱的条件太温和：逐渐增加咪唑的浓度或进行咪唑浓度线性洗脱，或者降低 PH 去确定最佳洗脱条件。注意，PH 低于 3.5 容易导致镍离子脱落。
2. 蛋白在柱子中沉淀：降低蛋白浓度，用咪唑线性洗脱。使用添加剂或者改变 NaCl 的浓度，或者在变性的条件下洗脱（加 4-8M 的尿素或者 4-6M 的盐酸胍）。
3. 非特异性的疏水或者其他作用：在洗脱液中加非离子的添加剂（例如 0.2% 的 Triton X-100）或者增加 NaCl 的浓度。

-
4. 蛋白和柱子接触时间过长：可以减少蛋白和柱子的接触时间。

问题 4：洗脱的蛋白不纯

回答：

1. 目的蛋白被蛋白酶部分降解：增加蛋白酶抑制剂。
2. 杂质对镍离子有高度亲和性：用一个梯度的或者线性的咪唑浓度进行洗脱，确定一个适合的咪唑浓度。在样品中加入和 binding buffer 中同样的咪唑浓度。
3. 杂质和目的蛋白有相互作用：在洗脱液中增加添加剂的浓度（如增加到 2% Triton X-100 或者 2% Tween 20），或者增加甘油（增加至 50%）来破坏非特异性结合。
4. 超声条件与温度：检查超声破碎的条件是否太剧烈或温度控制是否合适。
5. 优化金属离子：使用 HiTrap TALON 柱子（ CO^{2+} 代替 Ni^{2+} ）。
6. 双标签纯化：在重组蛋白上同时添加 His 标签和 StrepII 标签。
7. 多步纯化：在亲和层析后可以选择添加离子交换层析和凝胶过滤层析，进一步提高目的蛋白的纯度。

优宁维 生物

www.univ-bio.com

抗体专家！ 免费查询服务！