



## 产品使用说明书

# His • Tag 融合蛋白纯化操作手册

\*建议同时参考本说明书英文原文（说明书编号TB273）。

采用 pET 系统进行原核蛋白表达，蛋白的表达量达到 20mg/100ml 培养物并不是困难的事。在大肠杆菌中表达的目的蛋白，其可溶性（可溶蛋白或包涵体）、细胞定位（细胞质、细胞周质、培养基上清），都会对后续的纯化策略造成影响。我们建议研究者在蛋白表达后，首先进行目的蛋白的细胞定位（请参考 pET 系统操作手册）；在进行大量纯化之前，小量纯化蛋白，摸索确定适合于具体蛋白的纯化条件，也是值得推荐的好方法。外源蛋白在大肠杆菌中表达，可能以可溶形式存在，也可能以包涵体形式存在。尤其在高水平表达的条件下，更容易形成包涵体。包涵体的形成与外源蛋白本身性质、载体、宿主菌、以及表达水平都有关系，可以通过选择不同表达载体和 E.coli 宿主菌组合，摸索生长条件和适宜诱导条件，达到优化蛋白表达的目的。His-Tag®融合蛋白，可以在天然条件或变性条件下用 NTA His-Bind 树脂或 IDA His-Bind 树脂进行纯化。

## 内容提要

### 一、亲和纯化样品的前处理

1. 菌液体积-起始目的蛋白量
2. 细菌裂解获得可溶蛋白
  - BugBuster Master Mix 蛋白抽提方法
  - 机械破碎（如超声等）

### 二、亲和纯化步骤

#### Ni-NTA 树脂纯化

1. Ni-NTA 树脂的兼容性
2. 天然条件纯化
  - 柱层析
  - FPLC
  - 批次小量纯化
3. 变性条件的纯化
  - 柱层析
  - FPLC 纯化
  - 批次小量纯化
4. 树脂再生
5. 常见问题与改善建议

#### 附录：补充背景知识

- NTA 和 IDA 化学基团
- His-Bind 基质选择指南
- 在确定裂解方法前的考虑
- 蛋白可溶性及细胞定位
- 天然或变性条件下目的蛋白的纯化
- 批次小量纯化或柱层析纯化方法
- 目的蛋白的结合
- 杂蛋白
- 如何降低非特异性结合
- 漂洗杂蛋白
- 目的蛋白的洗脱
- 纯化真核表达体系来源的 His-Tag 融合蛋白
- His-Tag 融合标签的去除
- 推荐资料

## 一、亲和纯化样品的前处理

### 1. 菌液体积-起始目的蛋白量

纯化条件的优化需考虑多个因素，包括 His-Tag 融合蛋白表达水平和上样量。若目的蛋白未能高效表达，需要采用一个较高的浓缩系数（concentration factor）进行菌的裂解，即在较大培养体系中，按一定比例加入一定体积的裂解/结合缓冲液。浓缩系数定义为菌液体积与裂解/结合缓冲液体积之比。不同目的蛋白表达水平推荐使用的裂解/结合缓冲液体积、对应的浓缩系数大小，请参考表 1。

例如，某蛋白表达水平约为 0.1mg/ml，需要在变性条件下进行小批提纯，则 100ml 的培养物离心获得的菌体，按浓缩 100 倍比例重悬于含变性剂的 1ml 裂解/结合缓冲液中。

在非变性条件下进行纯化时，要准确预计裂解液中可溶蛋白的含量比较困难，一般建议采用 50-100 倍浓缩。

表 1 确定所需菌液体积

His-Tag 融合蛋白浓度	表达水平	培养体积	His-Tag 融合蛋白总量	浓缩系数 (在 1ml 溶液中裂解后)
<b>变性条件</b>				
50mg/L	40%	3ml	150μg	3×
10mg/L	8%	10ml	100μg	10×
2mg/L	1.6%	25ml	50μg	25×
0.5mg/L	0.4%	50ml	25μg	50×
0.1mg/L	0.8%	100ml	10g	100×
<b>天然条件</b>				
>1mg/L	>1%	50ml	>50g	50×
<1mg/L	<1%	100ml	<100g	100×

与其它亲和纯化介质一样，His-Bind 树脂在接近其结合载量时使用，可以获得最好蛋白分离效果。所以在蛋白纯化前估计细菌抽提物中目的蛋白的含量，有利于确定上样量、选择合适体积的亲和树脂或预装柱。SDS-PAGE, Western blot, S-Tag™ Rapid Assay, FRETWorks™ S-Tag Assay 等方法都可用于确定抽提物中目的蛋白的含量。

### 2. 细菌裂解获得可溶蛋白

#### • BugBuster Master Mix 蛋白抽提方法

BugBuster Master Mix（货号 71456）是将 BugBuster 蛋白抽提试剂，Benzonase 核酸酶和 rLysozyme™ 溶菌酶溶液按最优化配比混合好的一种非常方便使用的蛋白抽提试剂，有助于在最优化条件下获得可溶活性蛋白。这种预混形式的试剂减少了稀释试剂、计算各种试剂使用量和分别添加的麻烦。100ml 和 500ml 包装分别足够用于 20g 和 100g 细胞沉淀的可溶蛋白抽提。

#### 可溶蛋白制备

采用此操作抽提到的蛋白包括来自细胞周质和细胞质的可溶蛋白。如果欲仅收集周质部分蛋白，可以参考 Novagen 的 TB055 “PET 系统操作手册”中提到的渗透休克方法或其它合适的方法。渗透休克方法中得到的沉淀也可以用于以下操作以获得细胞质中的可溶蛋白。

1. 用经预先称重的离心管 10,000g 离心 10 分钟从液体培养体系收集细胞。如果是小规模培养（如 1.5ml 或更少），可以用 1.5ml 离心管 14,000–16,000g 离心。尽量倾去液体，称量细胞沉淀湿重。
2. 室温下用吸打或温和涡旋使 BugBuster Master Mix 与细胞沉淀混匀，每克细胞糊需要 5ml 抽提试剂。这相当于 50ml 培养液采用 2.5ml 抽提试剂。如果是小规模培养，则采用约 1/5 培养体积的抽提试剂重悬沉淀（例如，1.5ml 培养液采用 300μl 抽提试剂）。如果抽提试剂过量也没有什么副作用。

**选做：**加蛋白酶抑制剂。BugBuster Master Mix 与蛋白酶抑制剂兼容。如果目的蛋白后续要用凝血酶（货号 69671），Xa 因子（货号 69036）或重组肠激酶（货号 69066）处理，就应该避免使用丝氨酸蛋白酶抑制剂。尽管纯化过程可能去除活性抑制剂，建议在酶切前最好做透析或凝胶过滤。

3. 室温下将重悬的细胞液在摇板或低速搅拌器上孵育 10-20 分钟。

**注意：**孵育后获得的抽提物不是粘稠的。

4. 4℃ 下 16,000g 离心 20 分钟以去除不溶的细胞碎片。如果需要，沉淀可以留作“包涵体纯化”（见以下说明）的材料。
5. 将上清转入另一个新试管。这样抽提得到的可溶蛋白溶液可以直接上样于 Novagen 的纯化树脂（以及其它很多类似纯化系统）。蛋白溶液在冰上可以短时存放（2-3 小时），也可在 -20℃ 长时间存放直至下步分析。蛋白抽提液应该根据目的蛋白的活性要求的温度存放，有些蛋白经冻融会失活。

## 高纯度包涵体的制备

以下操作可用于任何 BugBuster®系列产品抽提的包涵体纯化。

1. 如可溶蛋白抽提步骤1-4进行操作。
2. 将步骤“4”所得到的沉淀重悬于BugBuster（货号70584），BugBuster的量与当初重悬细胞糊的体积相同。吸打并涡旋以获得均匀的悬浮液。充分重悬沉淀能够溶解、去除杂蛋白以获得高纯度的包涵体。
3. 加入rLysozyme™溶液至终浓度为1KU/ml。温和涡旋混匀，室温孵育5分钟。  
*注意：如果采用的是BugBuster Master Mix就不需要另加rLysozyme了（即可省去此步操作）。*
4. 加入6倍体积的经1:10去离子水稀释的BugBuster重悬，涡旋1分钟混匀。
5. 于4℃，5,000g离心15分钟，以吸管移去上清，收集包涵体。
6. 将包涵体重悬于相当于原培养体系体积一半的经1:10稀释的BugBuster中，涡旋混匀，如步骤5离心。此步骤重复两次。再次重悬，于4℃，16,000g离心15分钟并去除上清。
7. 重悬最终的沉淀（即纯化的包涵体）于选定的缓冲液，最好是能与后续纯化方法兼容的缓冲液。包涵体可以重悬于Novagen的蛋白重折叠试剂盒（货号70123）中的1×溶解缓冲液（参考操作手册TB234）或其它变性剂。不溶的His•Tag®融合蛋白可以用含有变性剂的1×结合缓冲液重悬用于His•Bind®纯化（IDA或NTA）。

## 机械破碎（如超声等）

### 可溶蛋白的制备

稀释 8×储液制成 1×结合缓冲液，或按照缓冲液成分列表自己配制（参考 Novagen 目录或树脂英文说明书）。

1. 10,000g 离心 10 分钟收集菌体。弃上清，尽量去除培养基。按每 100ml 培养基所得菌体加入 4ml (1:25 v/v) 缓冲液，重悬于冰浴预冷的 1×结合缓冲液或 1×Fractogel 结合缓冲液中。也可加入 NP-40 或其他非离子型去污剂至终浓度 0.1%，以减少非特异性结合。若细菌菌体重悬困难，可使用匀浆器、搅拌器或超声仪帮助打散菌体。
2. 将重悬菌液置于合适大小的容器中，超声破碎。超声过程中保持菌液处于冰浴或盐冰浴中。超声条件依赖于所使用的超声仪功率、探头种类、容器的大小形状，须实验者自己摸索。应避免连续超声导致的大量产热，可分成短时间、多次超声。通过一定的间隔时间避免溶液过热。若 DNA 未能被超声剪切，裂解液会十分粘稠，可能阻塞色谱柱，降低流速，影响后续的纯化过程。大量的菌体可选用弗氏压碎法(French Press)。

可选做：

- (1) 细胞悬液中加入 rLysozyme 溶液（货号 71110）至终浓度 45-60KU/g 菌体。上下吹打混匀。30℃孵育 15 分钟，再进行超声破碎。
  - (2) 每 1ml 裂解液加入 1μl(25u) Benzonase 核酸酶（货号 70746 或 70664）用于重悬菌体。若需在无核酸酶条件下操作，不建议使用 Benzonase。蛋白纯化过程可能无法完全除去 Benzonase 核酸酶。  
*注意：也可选用 Lysonase™ Bioprocessing Reagent(货号 71230)，此试剂为 rLysozyme 和 Benzonase 核酸酶的混合物，可直接用于细菌裂解。每 1ml 裂解液加入 3μl 本试剂。即可实现高效裂解。*
  - (3) 加入蛋白酶抑制剂。蛋白酶抑制剂与 BugBuster 和 Benzonase 核酸酶兼容，可同时使用。如果目的蛋白后续要用凝血酶（货号 69671），Xa 因子（货号 69036）或重组肠激酶（货号 69066）处理，就应该避免使用丝氨酸蛋白酶抑制剂。尽管纯化过程可能去除活性抑制剂，建议在酶切前最好做透析或凝胶过滤。
3. 裂解物 14,000g 离心 20 分钟除去细胞碎片。离心后上清经 0.45μm 滤膜过滤，防止上样后阻塞树脂(此步操作使用注射器式滤器更方便)。

### 包涵体的制备

使用 1×结合缓冲液从大肠杆菌中分离、洗涤包涵体，除去杂质蛋白，再用含 6M 盐酸胍或 6M 尿素的 1×结合缓冲液溶解包涵体。

1. 10,000g 离心 10 分钟收集菌体。弃上清，尽量去除培养基。按每 100ml 培养基所得菌体加入 40ml 1×结合缓冲液比例重悬菌体。此步骤不加变性剂。
2. 按前述方法进行超声，重悬菌液，剪切降解核酸。
3. 5,000g 离心 15 分钟，包涵体和细胞碎片位于沉淀中。其他可溶蛋白部分位于上清中。
4. 移去上清，每 100ml 培养物的沉淀重悬于 20ml 1×结合缓冲液，重复第 3 步。可能需要超声以彻底重悬沉淀。

*注意：本步操作可加入 rLysozyme™ 溶液（非必要）帮助处理包涵体。已证实溶菌酶可消化细胞壁，提高包涵体纯度。将 rLysozyme 加入 1×结合缓冲液至终浓度 1KU/ml，轻柔混匀，孵育 5-10 分钟即可离心。*

5. 移去上清，按每 100ml 培养物加 5ml 缓冲液比例，加入含 6 M 盐酸胍或 6 M 尿素的 1×结合缓冲液重悬沉淀。
6. 冰浴孵育 1 小时，彻底溶解包涵体。16,000g 离心 30 分钟去除不溶成分，His-Bind 纯化之前用 0.45μm 滤膜过滤上清。

## 二、亲和纯化步骤

### Ni-NTA 树脂纯化

Ni-NTA His-Bind 树脂不能耐受高浓度还原剂，如 DTT、DTE，这些还原剂会还原 Ni 离子，使其无法与 His-Tag 融合蛋白结合。被还原的树脂呈棕色。多数情况下，可以使用巯基乙醇，其浓度可以加至 20mM。

EDTA、EGTA，或其它强螯合剂会与  $\text{Ni}^{2+}$  结合，将其从树脂上剥离下来。 $\text{Ni}^{2+}$  被螯合后，树脂呈白色。

对任何还原剂或螯合剂，请小心对待。若不能确定，请先在小量树脂上进行试用。应尽量避免缓冲液中含有任何高浓度供电子基团成分(如  $\text{NH}_4^+$ )、或裂解物中含诸如 Arg、Gln、Gly、His 等氨基酸。

菌体应在无强螯合剂(如 EDTA)、无强还原剂(如 DTT)、无离子型去污剂(如 SDS)的情况下裂解。尽管确实存在某些例子，在这些试剂存在的情况下成功纯化出目的蛋白，但还是建议大家避免使用这些试剂。

更多信息请参考 2。

### 1. Ni-NTA 树脂的兼容性

表 2. Ni-NTA HisBind 树脂与各种试剂的兼容性

试剂	作用	说明
<b>缓冲液试剂</b> Tris, HEPES, MOPS	带有仲胺或叔胺的缓冲液会将镍离子还原	有时 100mM 以下可用；推荐使用磷酸钠或磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液
<b>螯合试剂</b> EDTA, EGTA	会将镍离子从树脂上剥离	有时 1mM 以下可用，但一定要非常小心
<b>巯基试剂</b> $\beta$ -巯基乙醇  THP  DTT, DTE	防止分子间形成二硫键，高浓度时会将镍离子还原 防止分子间形成二硫键，高浓度时会将镍离子还原 低浓度时会将镍离子还原	10mM 以下可用。也尝试过 20mM，但需特别小心  1mM 以下可用  最多 1mM，但更推荐使用 $\beta$ -巯基乙醇或 THP
<b>去垢剂</b> 非离子去垢剂 (Triton, Tween, NP-40) 阳离子去垢剂 阴离子去垢剂 (SDS, Sarkosyl) BugBuster 蛋白抽提试剂	去除杂蛋白和核酸   从细胞中释放可溶蛋白	浓度可达 2%  浓度可达 1% 不推荐，但有成功实例浓度用到 0.3%  参照 Novagen 提供的产品使用说明
<b>变性剂</b> Gu-HCl 尿素	增溶蛋白	浓度可达 6M 浓度可达 8M
<b>氨基酸</b> 甘氨酸 谷氨酸 精氨酸 组氨酸	与 HisTag 中的组氨酸残基竞争结合 Ni-NTA	不推荐 不推荐 不推荐 低浓度(20mM)使用时可以防止非特异性结合，高浓度(>100mM)可以将 HisTag 融合蛋白从 Ni-NTA HisBind 树脂上洗脱下来
<b>其它添加剂</b> NaCl 甘油 乙醇 咪唑  碳酸氢钠 血红蛋白 铵 柠檬酸盐	防止离子间相互作用 防止蛋白间的疏水作用 防止蛋白间的疏水作用 与 HisTag 中的组氨酸残基竞争结合 Ni-NTA	浓度可达 2M，使用时浓度至少为 150mM 浓度可达 50% 浓度可达 20% 低浓度(20mM)使用时可以阻止非特异性结合，高浓度(>100mM)可以将 HisTag 融合蛋白从 Ni-NTA HisBind 树脂上洗脱下来 不推荐 不推荐 不推荐 有使用浓度 60mM 的成功实例



## 2. 天然条件纯化

在决定使用天然条件（非变性条件）进行蛋白纯化之前，首先需要确定蛋白是否可溶。即使目的蛋白大部分以不溶形式表达，仍有可能有少量可溶蛋白可以用 Ni-NTA His-Bind 树脂纯化出来。

在没有强变性剂如尿素的情况下，细胞裂解物中部分不稳定的蛋白可能容易被降解。最好始终保持蛋白溶液处于低温 0-4℃，并快速操作。加入 AEBSF 或蛋白酶抑制剂混合物系列 III 货号 101500 和 539134），可能帮助蛋白稳定（视具体情况而定），但是需要考虑到它们对重组蛋白的可能影响。

### 天然条件纯化所需缓冲液（试剂盒 70899）

1×Ni-NTA 结合缓冲液：（用于裂解和结合步骤）

50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0, 300mM NaCl, 10mM 咪唑

（加入 1/10 体积的 10×BugBuster 或溶菌酶能获得更好裂解效果。参见前述“制备细菌裂解物”部分。）

1×Ni-NTA 漂洗缓冲液：50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0, 300mM NaCl, 20mM 咪唑

1×Ni-NTA 洗脱缓冲液：50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0, 300mM NaCl, 250mM 咪唑

## 柱层析

需要破碎多少菌体根据所使用的表达体系和 His-Tag<sup>®</sup>融合蛋白的表达水平来决定。Ni-NTA His-Bind 树脂与不同 His-Tag<sup>®</sup>融合蛋白的结合能力不同，通常为 5-10mg/ml。如 Ni-NTA His-Bind 树脂或 Ni-NTA His-Bind Superflow 对 His-Tag DHFR（~26 kDa）的结合量为 0.3μmol/ml（8.0mg/ml）。请参考表 1 “如何确定所需菌液体积”。对于高表达水平的目的蛋白（每升培养基 10-50mg His-Tag 融合蛋白），可用 10 倍浓缩的细菌裂解物。4ml 10 倍浓缩的裂解物含有约 0.4-2mg 的 His-Tag 融合蛋白。对于低表达水平的蛋白（1-5mg/l 培养基），可以 50 倍浓缩，抽提 200ml 菌液，获得 4ml 的细菌裂解物（4ml 细菌裂解物=0.2-1mg His-Tag 融合蛋白）。

1×Ni-NTA 结合缓冲液包含 10mM 咪唑，用于降低杂蛋白与树脂的非特异性结合，减少所需漂洗步骤，获得更高目的蛋白纯度。若 His-Tag 融合蛋白在此条件下无法结合到柱上，咪唑的浓度可以降低至 1-5mM。许多 His-Tag 融合蛋白对 Ni<sup>2+</sup>有更高结合力，这种情况下结合缓冲液中的咪唑浓度可以增加至 20mM。

### 实验材料

- 从 40-200ml 菌液制备而得的澄清裂解液
- Ni-NTA His-Bind 树脂（货号 70666）
- 空色谱柱（货号 69673）
- 1×Ni-NTA 结合缓冲液
- 1×Ni-NTA 漂洗缓冲液
- 1×Ni-NTA 洗脱缓冲液

Ni-NTA 缓冲液试剂盒（货号 70899-3）提供各种缓冲液的浓缩储液。

1、将 1ml 50% Ni-NTA His-Bind 树脂悬液加入到 4ml 1×Ni-NTA 结合缓冲液中，轻柔混匀。待树脂自然沉降后，用枪头吸去 4ml 上清。

2、加入 4ml 制备好的裂解液，轻柔摇动混匀（旋转混合器，200rpm），4℃结合 60 分钟。

3、将裂解液 Ni-NTA His-Bind 树脂混合物加入下端封闭的空色谱柱中。

4、除去柱下端封闭盖子，收集流出液（穿过峰），保存用于 SDS-PAGE 电泳分析。

5、以 4ml 1×Ni-NTA 漂洗缓冲液漂洗 2 次，收集漂洗组分，用于 SDS-PAGE 电泳分析。

6、以 0.5 ml 1×Ni-NTA 洗脱缓冲液洗脱目的蛋白 4 次。将洗脱组分分为四部分收集，并走 SDS-PAGE 电泳分析各保存组分。

1×Ni-NTA 结合缓冲液、漂洗缓冲液和洗脱缓冲液的成分可以根据具体情况进行调整以满足实验者的具体需要，如加入 0.1%Tween、5-10mM B-巯基乙醇、蛋白酶抑制剂混合物系列 III、增加 NaCl 或甘油浓度等。树脂的试剂兼容性请参考表 2。

## FPLC

若需纯化大量蛋白，可以使用 FPLC 设备，需配合 Ni-NTA His • Bind Superflow 柱使用。Ni-NTA His • Bind Superflow 的物理稳定性使其适用于较高压力和流速的层析方式。

### 实验材料

- 从 40-200ml 菌液制备而得的澄清裂解液
- Ni-NTA His • Bind Superflow<sup>™</sup>（货号 70691）
- 1×Ni-NTA 结合缓冲液（缓冲液试剂盒货号 70899）
- 1×Ni-NTA 漂洗缓冲液



- 1×Ni-NTA 洗脱缓冲液
- FPLC 设备

1、按 FPLC 设备的安装要求，装好色谱柱。去除色谱柱的上端接头，关上柱下端开关。

2、彻底重悬体积比为 50% 的 Ni-NTA His • Bind Superflow 树脂悬液，倒入空柱中。

注意避免产生气泡。通过一根细玻棒，小心缓慢将树脂悬液加入空柱中。所需空色谱柱大小和树脂体积由待纯化的 His 融合蛋白总量决定。一般来说，Ni-NTA His • Bind Superflow 的载量为每 ml 树脂 5-10mg 蛋白。

3、使树脂沉降。

通过打开柱下方盖子，使缓冲液流动，可以加快树脂沉降过程。也可根据具体需要使用蠕动泵，但流速不可超过 2ml/min。

请注意避免缓冲液流干。若发生这种情况，用裂解缓冲液重悬树脂并重新装柱。在树脂完全沉降前，可以加入更多树脂悬液以增加柱床体积。

4、加入上端接头，调整至沉降树脂上端。

避免引入任何气泡。装好的色谱柱可以接入 FPLC 系统流路中。

5、以 5 倍床体积 1×Ni-NTA 结合缓冲液平衡色谱柱。

流速不可超过 2ml/min。

280nm 紫外监控，当用 5 倍床体积缓冲液平衡后，基线应稳定。

6、上样，以 1×Ni-NTA 结合缓冲液漂洗至  $A_{280}$  稳定。

通常 5-10 倍体积缓冲液即足够。

这一步骤中请注意系统压力。若样品很粘稠，压力可能超过建议值（10 bar）。可降低流速至 0.5-1ml/min。若 His 融合蛋白未结合，可进一步降低流速。在蛋白洗脱步骤时可以加大流速。收集流出组分，以备 SDS-PAGE 电泳分析。

7、以 1×Ni-NTA 漂洗缓冲液漂洗至  $A_{280}$  至基线。

通常 5-10 倍体积缓冲液即足够。收集流出组分用于 SDS-PAGE 电泳分析。

8、以 1×Ni-NTA 洗脱缓冲液洗脱目的蛋白。

根据需要可采用梯度洗脱。每个洗脱梯度（咪唑浓度梯度可以通过将洗脱缓冲液与漂洗缓冲液按一定体积比例混合获得）通常 5-10 倍体积缓冲液即足够。His • Tag 融合蛋白一般在第二、第三个柱体积时洗脱下来。

注意：咪唑 280nm 时也有光吸收，若只有少量 His 融合蛋白洗脱，蛋白吸收峰受咪唑影响不易看出。

## 批次小量纯化

实验材料

- 小离心管
- 溶菌酶（货号 71110）
- Ni-NTA His • Bind 树脂（货号 70666）
- 1×Ni-NTA 结合缓冲液（缓冲液试剂盒货号 70899）
- 1×Ni-NTA 漂洗缓冲液
- 1×Ni-NTA 洗脱缓冲液

1、取 1ml 菌液，加入一个小离心管中。

需要破碎多少菌体依赖于目的蛋白的表达水平。若蛋白高水平表达，1ml 菌液所含目的蛋白就足够了（参考表

1）。若蛋白表达水平低，可能需要更大体积的菌液。若需要检测诱导培养时间对蛋白表达水平的影响，每隔 30 分钟从培养体系中取出 1ml 菌液，离心收集菌体，-20℃ 保存，直至所有样品收集完全。

2、15,000g 离心 1 分钟，收集菌体，弃上清。

若需要更大体积的菌液，可向离心后去除上清的离心管中再加入菌液，再次离心，从而获得更多菌体。

3、将细胞沉淀在 -20℃ 冷冻 15-20min。

4、将细胞完全解冻，用 100  $\mu$ l 1×Ni-NTA 结合缓冲液重悬菌体。

若仅取 1ml 菌液，浓缩系数为 10，对于某些需要在天然条件下纯化的蛋白来说可能不够，请参考表 1。

5、加入溶菌酶 4.5-6KU 30 度孵育 15min。

6、轻柔涡旋，裂解细胞，避免起泡。

可选做：每 100  $\mu$ l 重悬细胞加入 2.5u Benzonase 核酸酶。可将 Benzonase 稀释 10 倍（2.5u/ $\mu$ l）以方便取用（稀释缓冲液请垂询）。

7、裂解物 15,000g 离心 10min。除去细胞不溶残片，上清转入干净小管中。

8、每管加入 20  $\mu$ l 50% Ni-NTA His • Bind 树脂悬液（相当于 10  $\mu$ l 树脂，可结合 50-100  $\mu$ g His • Tag<sup>®</sup> 融合蛋白），4℃ 轻柔混匀，结合 30 分钟。

9、15,000g 离心 10 s 沉淀树脂，取 10  $\mu$ l 上清转入另一干净小管中，以备电泳分析。弃去其它上清。

上清留样保存于冰上。



上清样品包含无法与树脂结合的蛋白。

10、用 100  $\mu$ l 1 $\times$ Ni-NTA 漂洗缓冲液漂洗树脂 2 次。

每次漂洗步骤包括 15,000g 离心 10 秒，小心吸去上清。

11、用 20  $\mu$ l 1 $\times$ Ni-NTA 洗脱缓冲液洗脱目的蛋白 3 次。

每次洗脱步骤包括 15,000 g 离心 10 秒，小心将上清转移至干净小管中。

12、SDS-PAGE 分析第 8 步（未结合组分）和第 10 步洗脱组分。

### 3. 变性条件的纯化

变性条件纯化所需缓冲液

变性裂解 / 结合缓冲液

Buffer A: 6M Gu-HCl; 0.1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 0.01M Tris-Cl, pH8.0

Buffer B: 8M 尿素; 0.1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 0.01M Tris-Cl, pH8.0

变性漂洗缓冲液

Buffer C: 8M 尿素; 0.1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 0.01M Tris-Cl pH6.3

变性洗脱缓冲液

Buffer D: 8M 尿素; 0.1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 0.01M Tris-Cl pH5.9

Buffer E: 8M 尿素; 0.1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 0.01M Tris-Cl pH4.5

注意: Buffer B、C、D、E 应在使用前调至适宜 pH 值，以避免尿素解离。

## 柱层析

实验材料

- 变性裂解 / 结合缓冲液裂解制备的细菌裂解物（20-200ml 菌液体积）。
- Ni-NTA His • Bind 树脂（货号 70666）
- 空色谱柱（货号 69673）
- Buffers A- E

1、将 1ml 50% Ni-NTA His • Bind 树脂悬液加到 4ml 细胞裂解液中，轻柔混匀（如旋转混合器 200rpm），室温结合 15-60min。

需要破碎多少菌体根据所使用的表达体系和 His • Tag<sup>®</sup>融合蛋白的表达水平。Ni-NTA His • Bind 树脂与不同的 His • Tag<sup>®</sup>融合蛋白的结合能力不同，通常为 5-10 mg/ml。如 Ni-NTA His • Bind 树脂或 Ni-NTA His • Bind Superflow 对 His • Tag DHFR（~26 kDa）的结合量为 0.3  $\mu$ mol/ml（8.0 mg/ml）。请参考表 1。

对于高表达水平的目的蛋白（每升培养基 50-100mg His • Tag 融合蛋白），可用 5 倍浓缩的细菌裂解物（如 20ml 菌液离心获得的菌体重悬于 4ml Buffer B）。4ml 5 倍浓缩的裂解物含有约 1-2mg 的 His • Tag 融合蛋白。对于低表达水平的蛋白（1-5 mg/1 培养基），可以 50 倍浓缩，抽提 200ml 菌液，获得 4ml 的细菌裂解物（4ml 细菌裂解物=0.2-1mg His • Tag 融合蛋白）。

2、将裂解液与 Ni-NTA His • Bind 树脂的混合物小心加入下端封闭的空色谱柱中。

3、除去柱下端封闭盖子，收集流出液（穿过峰），保存用于 SDS- PAGE 电泳分析。

4、以 4ml buffer C 漂洗杂蛋白 2 次。

保存漂洗组分用于 SDS- PAGE 电泳分析。

5、以 0.5ml buffer D 洗脱目的蛋白 4 次，再以 0.5ml buffer E 洗 4 次，收集组分，用 SDS-PAGE 分析。

蛋白单体通常用 buffer D 即可洗脱，而多聚体、聚合物和含两个 His • Tag 标签的蛋白通常由 buffer E 洗脱。

## FPLC 纯化

若需纯化大量蛋白，可以使用 FPLC 设备，需配合 Ni-NTA His • Bind Superflow 柱（货号 70691）使用。Ni-NTA His • Bind Superflow 的物理稳定性使其适用于较高压力和流速的层析方式。

实验材料

- 变性裂解 / 结合缓冲液制备的澄清裂解液
- Ni-NTA His • Bind Superflow（货号 70691）
- Buffers A-E
- FPLC 设备

1、按 FPLC 设备的安装要求，装好色谱柱。去除色谱柱的上端接头并将柱下端封闭。

2、彻底重悬一定体积 50% Ni-NTA His • Bind Superflow 树脂悬液，倒入空柱中。

注意避免产生气泡。通过一根细玻棒，小心缓慢将树脂悬液加入空柱中。所需空色谱柱大小和树脂体积由待纯化的 His • Tag<sup>®</sup>融合蛋白总量决定。一般来说，Ni-NTA His • Bind Superflow 的载量为每 ml 树脂 5-10 mg 蛋白。

3、使树脂沉降。



通过打开柱下方盖子，使缓冲液流动，可以加快树脂沉降过程。也可根据具体需要使用蠕动泵，但流速不可超过 2 ml/min。

请注意避免缓冲液流干。若发生这种情况，用裂解缓冲液重悬树脂并重新装柱。

在树脂完全沉降前，可以加入更多树脂悬液以增加床体积。

4、加入上端接头，调整至沉降树脂上端。

避免引入任何气泡。装好的色谱柱可以接入 FPLC 系统流路中。

5、以 5 倍床体积 buffer B 平衡色谱柱。

280nm 紫外监控，当用 5 倍床体积缓冲液平衡后，基线应稳定。

6、上样，以 buffer B 洗至  $A_{280}$  低于 0.01，通常 5-10 倍体积缓冲液即足够。

开始时控制流速在 1ml/min。注意系统压力。若样品很粘稠，压力可能超过建议值（10bar）。也可根据需要降低流速。收集流出组分，以备 SDS-PAGE 电泳分析。

7、以 buffer C 漂洗至  $A_{280}$  小于 0.01。

通常 5-10 倍体积缓冲液即足够。

Buffer C 洗脱与树脂非特异性结合的组分，收集流出组分用于 SDS-PAGE 电泳分析。

8、以 buffer D 或 buffer E 洗脱目的蛋白。

若使用 buffer D 无法完全洗脱目的蛋白，可以使用 buffer E。蛋白单体通常用 buffer D 即可洗脱，而多聚体、聚合物和含两个 His • Tag 标签的蛋白通常由 buffer E 洗脱。一般 5 个柱体积的缓冲液即可充分洗脱蛋白。

His • Tag 融合蛋白通常在第二、第三个柱体积时出峰。

## 批次小量纯化

实验材料

- 小离心管
- Ni-NTA His • Bind 树脂（货号 70666）
- Buffers A, B, C, E

1、取 1ml 菌液加入一个小离心管中。

需要破碎多少菌体依赖于目的蛋白的表达水平。若蛋白高水平表达，1ml 菌液所含目的蛋白就足够了（参考表 1）。若蛋白表达水平低，可能需要更大体积的菌液。

若需要检测诱导培养时间对蛋白表达水平的影响，每隔 30 分钟从培养体系中取出 1ml 菌液，离心收集菌体，-20℃ 保存，直至所有样品收集完全。

2、15,000g 离心 1min，收集菌体，弃上清。

若需要更大体积的菌液，可向离心后去除上清的离心管中再加入菌液，再次离心，从而获得更多菌体。

3、以 200  $\mu$ l Buffer B 重悬菌体。轻柔涡旋裂解细胞，避免起泡。

裂解完全后，溶液变为半透明状态。多数蛋白在 Buffer B 中可溶。若溶液无法变透明，以 buffer A 裂解细胞。

4、15,000g 离心 10min，除去细胞不溶残片，上清转入干净小管中。

5、每管加入 50  $\mu$ l 50% Ni-NTA His • Bind 树脂悬液（相当于 25  $\mu$ l 树脂，可结合 125-250  $\mu$ g His • Tag<sup>®</sup>融合蛋白），轻柔混匀，室温结合 30min。

6、15,000g 离心 10s 沉淀树脂，取 10  $\mu$ l 上清转入另一干净小管中，以备电泳分析，弃去其它上清。上清留样保存于冰上。

上清样品包含无法与树脂结合的蛋白。

7、以 250  $\mu$ l buffer C 漂洗树脂 2 次。

每次漂洗步骤包括 15,000g 离心 10 s，小心吸去上清。

8、以 25  $\mu$ l buffer E 洗脱目的蛋白 3 次。

每次洗脱步骤包括 15,000g 离心 10 s，小心将上清转移至干净小管中。

9、SDS-PAGE 电泳分析各组分。

若使用 buffer A 裂解菌体，含盐酸胍的样品需要事先处理方能用于 SDS-PAGE 电泳上样。

## 含胍样品进行 SDS-PAGE 电泳前的处理

由于含盐酸胍的样品在用 SDS 处理时会形成沉淀，在进行 SDS-PAGE 电泳前，样品须用水稀释（1:6 稀释），或透析、或采用 TCA 沉淀除去盐酸胍。

**TCA 沉淀**

1、将 10-25  $\mu$ l 蛋白样品用水稀释到 100  $\mu$ l

2、加入 100  $\mu$ l 10% TCA

3、冰浴 20 分钟；小离心机离心 15min

4、以 100  $\mu$ l 预冷乙醇洗涤沉淀，干燥沉淀，以电泳上样缓冲液重悬。若还有少量盐酸胍存在，样品必须在 95℃ 加热 7 分钟后，迅速上样。



## 4. 树脂再生

Ni-NTA His•Bind树脂能否反复使用主要取决于样品的特性，只能在纯化同一种重组蛋白是树脂才可以反复使用。建议树脂再生不超过5次。如果Ni-NTA树脂由浅蓝色变为棕灰色就应该采用以下方法对树脂进行再生处理了。

采用以下步骤洗柱：1倍体积即柱床体积。

第1步 2倍体积再生缓冲液（6M Gu-HCl, 0.2M醋酸）

第2步 5倍体积水

第3步 3倍体积2% SDS

第4步 1倍体积25%乙醇

第5步 1倍体积50%乙醇

第6步 1倍体积75%乙醇

第7步 5倍体积100%乙醇

第8步 1倍体积75%乙醇

第9步 1倍体积50%乙醇

第10步 1倍体积25%乙醇

第11步 1倍体积水

第12步 5倍体积100mM EDTA, pH8.0

第13步 10倍体积水

第14步 2倍体积100mM NiSO<sub>4</sub>

第15步 2倍体积水

第16步 2倍体积再生缓冲液

第17步 2倍体积适合的缓冲液平衡（例如1×Ni-NTA结合缓冲液，buffer A或buffer B）

## 5. 常见问题与改善建议

现象 可能原因	建 议
<b>蛋白无法与 Ni-NTA His • Bind 树脂结合</b>	
目的蛋白无 HisTag 序列	测序以确定连接处序列和阅读框是否正确。检查是否存在内部翻译起始位点（若 HisTag 序列构建于目的蛋白 N 端），或翻译提前终止（若 HisTag 序列构建于目的蛋白 C 端）
HisTag 序列空间难以接近	变性条件下纯化蛋白；或将 HisTag 序列构建于目的蛋白另一末端
HisTag 序列已被降解	检查穿过组分中是否有带有 HisTag 的片段
结合条件不对	检查所有溶液的 pH 值和组成成分 尿素的解离常导致 pH 值的变化。应在使用之前测定缓冲液 pH 值，迅速投入使用 确保体系中没有螯合剂和还原剂存在；咪唑的浓度太高也会导致蛋白不能与树脂结合
<b>目的蛋白在漂洗步骤提前被洗出</b>	
洗脱条件过于严格	降低咪唑浓度，或增加缓冲液 pH 值
HisTag 标签被部分隐藏 / 屏蔽	降低洗脱条件的严格程度。变性条件下纯化目的蛋白
缓冲液条件不正确	检查漂洗缓冲液的 pH 值和组成 确保体系中含螯合剂及还原剂
<b>蛋白在纯化过程中形成沉淀</b>	
温度过低	改为室温纯化
蛋白形成聚合物	尝试加入增加溶解度的试剂，如 0.1% Triton X-100 或 Tween-20，高达 10mM $\beta$ -ME 或 1mM THP，高达 2M NaCl，或帮助稳定蛋白的因子，如 $Mg^{2+}$ 。某些情况下，可能需要在纯化过程所有缓冲液中加入这些成分以保持蛋白的可溶性
<b>目的蛋白无法洗脱</b>	
洗脱条件太温和 （蛋白可能以聚合物或多聚体形式存在）	以 pH 梯度或咪唑梯度洗脱，确定最佳洗脱条件
蛋白洗脱时在柱中沉淀	变性条件下进行洗脱。以在离心管中结合、洗脱的小量批次方式进行纯化，以避免局部蛋白浓度过高
<b>目的蛋白与杂蛋白一起洗脱出来</b>	
结合和漂洗缓冲液的条件不够严格	在结合和漂洗缓冲液中加入 10-20mM 咪唑
色谱柱载量相对过大	减少 Ni-NTA His • Bind 树脂或 Ni-IDA His • Bind 树脂用量
杂蛋白与目的蛋白结合，共纯化下来	加入 10 mM $\beta$ -ME 或 1mM THP 以避免杂蛋白与目的蛋白之间形成二硫键 加大漂洗缓冲液的盐浓度，或增加去污剂浓度，加入乙醇/甘油以破坏蛋白之间的疏水作用
杂蛋白是目的蛋白不完整产物	检查是否存在可能的内部翻译起始位点（若 HisTag 序列构建于目的蛋白 C 端），或翻译提前终止（若 HisTag 序列构建于目的蛋白 N 端） 避免目的蛋白在纯化过程中降解，如保持在 4℃ 进行操作，使用蛋白酶抑制剂等。
<b>树脂变色</b>	
Ni 离子流失或被还原	确保体系中含螯合剂（Ni 离子被螯合掉之后，树脂变白色）或还原剂（树脂变棕色）

## 附录：补充背景知识

### • NTA 和 IDA 化学基团

使用 His-Tag®/ His.Bind® 技术，可根据作为 His-Tag 序列的组氨酸与固定化金属离子（通常为  $\text{Ni}^{2+}$  或  $\text{Cu}^{2+}$ ）的亲合力来进行纯化。金属整合到固相支持物共价结合的反应性基团上。最常用的螯合物包括氮川乙酸（NTA）和亚氨基二乙酸（IDA），它们分别具有四个和三个与金属离子相互作用的位点。在天然和变性条件下，这两种化学基团的亲和介质以及其目标蛋白的结合、洗涤和洗脱条件的特性不尽相同。实际应用中，NTA 因多一个螯合位点，使纯化过程中金属浸出最小，并与还原二硫的 20mM  $\beta$ -巯基乙醇相容。缓冲液中存在其它螯合或还原成分时，由于 IDA 树脂金属浸出率高而纯化结果通常不够好。然而，IDA 介质可以循环使用几百次而性能基本保持不变。对于不同介质，可以通过改变条件优化，从而使目的蛋白的纯化效果达到最佳。最为常见的优化方法是通过调整天然条件下洗涤和洗脱缓冲液的咪唑浓度，尽量减少非特异结合蛋白的共纯化。

### • His.Bind 基质选择指南

产品	类型	载量	特点	应用
Ni-NTA His.Bind resin	带 Ni 的 NTA 琼脂糖	5-10mg/ml	最小的 $\text{Ni}^{2+}$ 浸出 与 20mM $\beta$ -ME 相容	小到中量 重力流柱 推荐用于真核抽提物
Ni-NTA His.Bind Superflow	带 Ni 的 NTA 超流速琼脂糖	5-10mg/ml	最小的 $\text{Ni}^{2+}$ 浸出 与 20mM $\beta$ -ME 相容 耐高流速与压力	小量到生产级 FPLC 或重力流柱 推荐用于真核抽提物
His.Bind Resin	无 Ni 的 IDA 琼脂糖	8mg/ml	可重复使用多次 与 His.Bind 缓冲试剂盒兼容	小到中量 重力流柱或批次模式
His.Bind Cloumn	带 Ni 的 IDA 琼脂糖 1.25ml 预装柱	10mg/次	预装柱 与 His.Bind Quick 缓冲试剂盒兼容	方便的纯化 重力流柱
His.Bind Fractogel (M)	无 Ni 的 IDA Fractogel 触须	10-30mg/ml	与 1mM THP 兼容 40-90 $\mu\text{m}$ 颗粒大小 耐高流速与压力	小量到生产级 FPLC 或重力流柱
His.Bind Quick 300 Cartridge	带 Ni 的 IDA 纤维素预装筒	0.5mg/次	每端锁紧接口 与 His.Bind Quick 缓冲试剂盒兼容	注射器操作 真空歧管操作 快速纯化
His.Bind Quick 900 Cartridge	带 Ni 的 IDA 纤维素预装筒	2mg/次	每端锁紧接口 与 His.Bind Quick 缓冲试剂盒兼容	注射器操作 真空歧管操作 快速纯化
His.Bind Quick Cloumn	带 Ni 的 IDA 纤维素预装柱	5mg/次	每端锁紧接口 与 His.Bind Quick 缓冲试剂盒兼容	真空歧管操作 快速纯化多个样品
His.Bind Magnetic Agarose Beads	带 Ni 的 IDA 磁性琼脂糖	5mg/ml	3 $\mu\text{m}$ 磁性琼脂糖珠子 与 1mM THP 兼容	快速小量纯化 磁性分离 适合高通量操作

\*若需了解关于各种 融合蛋白纯化用树脂和预装柱更详细的资料，请参考默克生化印制的《蛋白质组研究工具产品手册》和 Novagen 原版目录。

\*与其它亲和纯化介质一样，His.Bind 树脂在接近其结合载量时使用，可以获得最好蛋白分离效果。所以在蛋白纯化前估计细菌抽提物中目的蛋白的含量，有利于确定上样量、选择合适体积的亲和树脂或预装柱。SDS-PAGE, Western blot, S-Tag™ Rapid Assay, FRETWorks™ S-Tag Assay 等方法都可用于确定抽提物中的目的蛋白的含量。在 His-Tag/GST-Tag 融合蛋白纯化和检测产品使用说明书中，也可以找到相应的推荐产品。

### • 在确定裂解方法前的考虑：

是选用机械破碎方法，还是选用 PopCultre® 或 BugBuster 试剂，配合 Lysonase™ 或 Benzonase® 核酸酶以及 rLysozyme™ 溶液用于可溶蛋白，包涵体抽提以避免机械破碎对目的蛋白的破坏。

若目的蛋白需要还原环境保护，可使用 0.5M THP 溶液(货号 71194)。THP [Tris(hydroxypropyl)phosphine] 为水溶性、无嗅的中性还原剂，比巯基乙醇更为稳定和高效，更耐空气氧化，1.0mM THP 可与 His.Bind 树脂兼容。



请注意使用 His-Bind 树脂时缓冲液中应避免使用  $\beta$ -巯基乙醇、DTT 和 EDTA。还原剂会与  $\text{Ni}^{2+}$  反应生成棕色沉淀物。EDTA 会螯合  $\text{Ni}^{2+}$ ，将其从树脂上剥离下来。

若需要，可在缓冲液中加入蛋白酶抑制剂防止蛋白降解。许多情况下并不需要加入蛋白酶抑制剂，建议首先在不加抑制剂的情况下进行实验。丝氨酸蛋白酶抑制剂的使用尤其要小心。若纯化的蛋白须经凝血酶（货号 69671-3），Xa 因子（69036-3）或重组肠激酶（货号 69066-3）酶切以除去融合标签，溶液中存留的少量丝氨酸蛋白酶抑制剂都可能影响切割反应的效率。若发现存在目的蛋白的水解，需要加入蛋白酶抑制剂时，请尝试加入：AEBSF（10-100 $\mu\text{M}$ ；Calbiochem 货号 101500）；Pepstatin A（1 $\mu\text{M}$ ；Calbiochem 货号 516482）；Leupeptin（10-100 $\mu\text{M}$ ；Calbiochem 货号 108975）；Aprotinin（2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ；Calbiochem 货号 616398）；Benzamidine（15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ；Calbiochem 货号 324890）；或蛋白酶抑制剂混合物系列 III（无 EDTA；Calbiochem 货号 539134）。尽管实验显示抑制剂在纯化过程中可被除去或失活，建议在进行蛋白酶切反应之前进行一步透析或凝胶过滤以彻底排除抑制剂的可能影响。

## • 蛋白可溶性及细胞定位

由于 His-Tag 融合蛋白与  $\text{Ni}^{2+}$  的结合不依赖于 His-Tag 标签的三级结构，蛋白可以在天然或变性条件下纯化。若需确立最佳纯化策略，应首先进行目的蛋白的细胞定位，判断所表达蛋白是可溶形式还是包涵体，是定位于细胞质还是细胞周质。携带有信号肽序列的外源蛋白可能分泌进入细胞周质，但这依赖于宿主菌、信号肽序列以及重组蛋白本身的性质。

注意：在外源蛋白 N 端构建了分泌信号肽，则 His-Tag 融合标签不能构建于 N 端，因为在跨膜进入细胞周质腔时，His-Tag 标签可能与信号肽一起被切掉。

## • 天然或变性条件下目的蛋白的纯化

选择在天然或变性条件纯化目的蛋白，需要考虑到蛋白的定位、可溶性、His-Tag 空间上的可接近性、目的蛋白下游应用，以及是否需保持蛋白生物活性等因素。另外，若蛋白在后续应用时必须保持活性，则需考虑蛋白是否可以有效复性，方可采用变性条件纯化，并在纯化后进行蛋白重折叠与复性。

### 天然条件下目的蛋白纯化

His-Tag 融合蛋白必须以可溶形式表达，方可在天然条件下进行纯化。即使表达的大部分目的蛋白都以包涵体形式存在，通常还是存在部分可溶蛋白，可以在天然条件下纯化得到。天然条件下，可以将 His-Tag 融合蛋白与其结合蛋白（如表达细胞中存在的酶的亚基和其结合蛋白）共纯化，结合蛋白可在纯化之前加入裂解液中，也可在 His-Tag 融合蛋白与亲和基质结合之后再加入。

天然条件下杂蛋白的非特异性结合通常比变性条件下的非特异性结合程度高。天然条件纯化时，第一次漂洗有更多的杂蛋白被洗下，正反映了这一点。可以通过在裂解/结合缓冲液和漂洗缓冲液中加入低浓度的咪唑（10-20mM）来降低非特异性结合（例如选用 1 $\times$ Ni-NTA 漂洗缓冲液，货号 70925，含有 20mM 咪唑）。

在极少数情况下，His-Tag 融合标签可能被目的蛋白的三级结构隐藏，从而阻碍了 His-Tag 序列与  $\text{Ni}^{2+}$  的结合。这种情况下，可溶蛋白也需要变性方能进行金属离子螯合层析。建议在蛋白纯化过程中，设立一个变性条件下纯化目的蛋白的对照。若蛋白只能在变性条件下能与树脂结合，但目的蛋白又不适合变性纯化，通常可以通过将 His-Tag 标签构建至目的蛋白另一末端来解决这一问题。

由于各种不同目的蛋白的结构对蛋白与树脂的结合有不同的影响，很难给出一个 His-Tag 融合蛋白在天然条件下纯化的通用流程，然而也有一些优化纯化流程的一般建议：

可用 BugBuster™ 蛋白抽提试剂温和裂解细菌，也可加入 Benzonase® 核酸酶降解核酸，降低裂解物粘度。

另外，也可通过溶菌酶处理后超声或高压匀浆的方法裂解菌体。为防止蛋白降解，菌体和裂解物应始终保持 0-4 $^{\circ}\text{C}$  低温，可能需要加入蛋白酶抑制剂。

裂解/结合缓冲液及漂洗缓冲液中加入低浓度咪唑有助于减少杂蛋白的非特异性结合。

缓冲液保持一定离子强度有助于减少杂蛋白与目的蛋白之间的非特异性结合，以及杂蛋白与树脂基质间的非特异性结合。结合和漂洗时缓冲液中最低盐浓度为 300mM NaCl，最高可达 2M NaCl（请参考表 2）。

含前导信号肽序列的蛋白，可通过渗透休克，从细胞周质组分中纯化出分泌蛋白，计算蛋白分泌表达的效率（请参考 pET 系统手册““细胞周质蛋白样品制备”部分）。

### 变性条件下目的蛋白的纯化

在多种表达体系中，重组蛋白的高水平表达常导致形成不溶聚合物，在大肠杆菌中被称为包涵体。强变性条件如 6M 盐酸胍、8M 尿素可彻底溶解细胞、包涵体和 His-Tag 融合蛋白。其他变性剂和去污剂也可能有效，但是选择那种变性剂以及所使用的浓度都需根据具体情况进行摸索确定。变性条件下，融合蛋白的 His-Tag 序列充分暴露，与  $\text{Ni}^{2+}$  的结合充分，而且由于杂蛋白的非特异性结合减少，能获得更高的纯化效率。

变性条件下纯化的目的蛋白是否需要复性，视目的蛋白不同应用而定。蛋白的复性和重折叠可以在从树脂上洗脱之前进行，也可在洗脱后的溶液中进行（请参考蛋白重折叠试剂盒 70123 操作说明书）。



## • 小批纯化或柱层析纯化方法

蛋白可以采用柱层析或批量操作的方式进行纯化。批量纯化的方法使蛋白溶液与树脂悬液可以在小管中充分混合结合，再将蛋白-树脂混合物加入柱中进行漂洗、洗脱步骤，或直接在管中漂洗洗脱目的蛋白。这种方法能促进 His-Tag 融合蛋白与树脂的充分结合，在 His-Tag 序列未充分暴露以及裂解液中蛋白浓度过低的情况下，尤其适合采用批量纯化方法。

在柱层析方法中，首先装柱，平衡树脂后再上样。将细菌裂解液缓慢加入到色谱柱中，漂洗杂蛋白，再洗脱目的蛋白，后续步骤与批量纯化方法相似。

## • 目的蛋白的结合

含有一个或多个 His-Tag 标签的融合蛋白，无论 His-Tag 位于蛋白的氨基端还是羧基端，通常能与 Ni-NTA 或 Ni-IDA 基团结合，其亲和力远高于抗体-抗原、或酶-底物的结合力。Ni<sup>2+</sup>与 His-Tag 的结合不依赖于蛋白的空间结构。即使在少数情况下，His-Tag 无法与 Ni 离子完全结合，但只要有两个以上组氨酸残基就会与 Ni 离子有一定的结合能力；一般来说，可与 Ni<sup>2+</sup>结合的 His 残基的数目越少，结合能力越弱。某些无 His-Tag 标签的宿主菌蛋白，由于其序列具有连续组氨酸，或几个组氨酸残基在蛋白表面，也可能与 Ni<sup>2+</sup>结合。但在多数情况下，这种相互作用要比 His-Tag 标签与 Ni<sup>2+</sup>的相互作用弱得多。这些可能造成干扰的杂蛋白可以通过相对严苛的漂洗条件（不影响目的蛋白与树脂的结合）除去。

目的蛋白可以经柱层析或批量纯化。若 His-Tag 融合蛋白在上样液中浓度低，或蛋白表达水平低，或分泌至培养基中，蛋白需用批量纯化方式进行结合和纯化，其结合缓冲液的配方应尽量满足以下条件：在不影响目的蛋白与树脂结合的基础上，干扰杂蛋白的结合。如缓冲液调至较低的 pH 值，加入低浓度咪唑（10-20mM）等。如果纯化结果还是有较多杂蛋白存在，建议在目的蛋白上样之前，用含咪唑的结合缓冲液（浓度≤20 mM）平衡树脂。树脂的结合基团得到“保护”，从而显著降低非特异性结合。

## • 杂蛋白

含有相邻连续的组氨酸残基的蛋白在大肠杆菌中不多，但在真核细胞中很多。这些蛋白与 Ni<sup>2+</sup>的结合力远低于 His-Tag 序列与 Ni<sup>2+</sup>的结合力，即使杂蛋白的含量远比目的蛋白含量高，也可以较容易地漂洗除去。在结合缓冲液和漂洗缓冲液中加入低浓度的咪唑，可以有效防止杂蛋白与树脂的结合。这一点在天然条件下纯化目的蛋白时，尤其重要。

在裂解缓冲液中加入 20mM β-ME（即 β-巯基乙醇），可以减少目的蛋白与杂蛋白之间形成二硫键的几率，避免杂蛋白与目的蛋白共纯化（Ni-NTA His-Bind 树脂与 20mM β-巯基乙醇兼容，但 Ni-IDA His-Bind 树脂与其不兼容），而且不可使用 DTT（请参考表 2）。

某些蛋白或核酸可以与目的蛋白非特异性结合，从而共纯化下来。这些杂质都可以通过采用一定的漂洗条件进行洗脱而除去。如加入低浓度去污剂（0.1-1% Triton X-100 或 0.5% Sarkosyl），增加盐浓度（可至 2M NaCl），或加入乙醇或甘油（可至 30%）以减少蛋白间的疏水相互作用。对于不同目的蛋白，需要具体摸索确定最佳漂洗条件。核酸也可以通过在最初的裂解步骤中加入 Benzonase 核酸酶处理而除去。

极少数情况下，某些宿主菌来源的蛋白能与 Ni-NTA His-Bind 或 Ni-NTA His-Bind Superflow™ 树脂基质本身相结合，这种情况可以改用其他基质的树脂，如 His-Bind Quick 或 His-Bind Fractogel® 树脂进行纯化。

截短表达的 His-Tag 融合蛋白，是经常出现的杂蛋白。如表达时目的蛋白从序列内部起始翻译（对 C 端融合 His-Tag 的蛋白而言），或翻译的提前终止（对 N 端融合 His-Tag 的蛋白而言），或在蛋白表达和纯化过程中部分降解的产物，可以通过其他方法检测 His-Tag 融合蛋白的大小，确定是否存在这样的问题（如对于某些的 pET 载体表达的蛋白，视其融合表达的标签情况，可选用 His-Tag™ Western Blot 试剂盒或 HSV-Tag® 单克隆抗体等）。

对于带有 His-Tag 标签的截短表达蛋白造成的污染，可能需要将 His-Tag 标签换至目的蛋白另一末端。对蛋白降解情况，可能需要在细菌裂解步骤时加入蛋白酶抑制剂，以尽量抑制目的蛋白的降解。

建议在纯化时选择合适的树脂量，使其载量接近需纯化的 His-Tag 融合蛋白的量。由于 His-Tag 融合蛋白与 Ni<sup>2+</sup>的亲和力高于其他背景杂蛋白，若 His-Tag 融合蛋白上样量接近使用的树脂载量，树脂上剩余的能与杂蛋白结合的位点很少，从而能获得更好的纯化效果。

## • 如何降低非特异性结合

使用 His-Bind 方法纯化目的蛋白时，天然条件与变性条件相比，可能有更多杂蛋白与树脂非特异性结合。裂解/结合缓冲液和漂洗缓冲液中加入低浓度的咪唑（10-20mM），有助于减少非特异性结合。His-Tag® 标签通过 6-10 个组氨酸残基上的咪唑环与 Ni 离子作用。咪唑本身也可与 Ni<sup>2+</sup>结合，破坏分散的组氨酸的咪唑环与 Ni<sup>2+</sup>的作用。6-10 个连续组氨酸标签与 Ni<sup>2+</sup>的结合力很强，所以低浓度的咪唑的存在能降低杂蛋白的非特异性结合。对于多数蛋白来说，在裂解/结合缓冲液和漂洗缓冲液加入高达 20mM 的咪唑都不会影响目的蛋白产量，若目的蛋白在此条件下无法结合到树脂上，咪唑的浓度可以调至 1-5mM。

His-Tag 融合蛋白与  $\text{Ni}^{2+}$  金属螯合与基质的结合与 His-Tag 标签的空间构象无关，也不受大多数变性剂和去污剂的影响（参考表 2）。若裂解/结合缓冲液中存在低浓度  $\beta$ -ME ( $\leq 20\text{mM}$ )，His-Tag-Ni-NTA 的结合仍能稳定，从而可以避免由杂蛋白与目的蛋白之间形成二硫键而与目的蛋白共纯化。Triton X-100 和 Tween-20 ( $\leq 2\%$ ) 等去污剂，或较高盐浓度 ( $\leq 2\text{ M NaCl}$ )（参考表 2）都不会影响 His-Tag-Ni-NTA 结合起来，从而也可用于减少杂蛋白与树脂基质之间的非特异性疏水相互作用或离子间相互作用。请注意 IDA His-Bind 树脂不能与  $\beta$ -ME 兼容。在金属离子螯合层析过程中，可能与某些 DNA/RNA 结合蛋白结合的核酸也可除去，并不影响目的蛋白产量。

## 漂洗杂蛋白

宿主菌本身 His 残基的蛋白，可能与  $\text{Ni}^{2+}$  有弱的结合，可以通过较严苛的漂洗条件除去这些杂蛋白。如调整 pH 值至 pH6.3，加入 10-50mM 咪唑。在大肠杆菌表达系统中，通常目的蛋白表达水平很高，与目的蛋白共纯化下来的杂蛋白一般较少，则不需使用太严苛的漂洗条件洗杂蛋白。若裂解物来自于真核表达体系，体系中可能含有连续组氨酸残基的杂蛋白相对较多，尤其在天然条件纯化时，背景更高。在这种情况下，需要考虑改进漂洗条件。如逐步降低漂洗缓冲液 pH 值，缓慢增加咪唑浓度等。在进行金属离子螯合层析时，咪唑浓度以分步梯度形式增加，漂洗杂蛋白的效果比线性梯度更好。对于不同蛋白，最佳漂洗条件可能略有不同，需要实际摸索确定。

## 目的蛋白的洗脱

洗脱目的蛋白有几种方式，如咪唑、pH 以及 EDTA。咪唑洗脱是其中条件最温和的，尤其适用于天然条件下纯化目的蛋白。因为 pH 值的降低、与金属离子同时洗脱都有可能影响纯化的目的蛋白。洗脱时咪唑浓度范围 100-250mM，咪唑环竞争 His 残基与  $\text{Ni}^{2+}$  的结合位点，从而导致蛋白被洗下。1×Ni-NTA 洗脱缓冲液含 250mM 咪唑，用于天然条件下洗脱目的蛋白。

His-Tag 融合标签上的组氨酸残基的 pKa 值约为 6.0，在 pH 值降低 (pH4.5-5.3) 时，组氨酸残基质子化，无法与  $\text{Ni}^{2+}$  结合，从而可以通过降低 pH 值洗脱目的蛋白。

洗脱条件可重复性很高，但针对每个特定 His-Tag 融合蛋白，需要具体摸索确定其最佳纯化条件。单体通常可以在约 pH 5.9 时洗脱下来，而聚合物和含有超过一个 His-Tag 标签的蛋白约在 pH4.5 时洗脱。

EDTA、EGTA 通过螯合树脂上的  $\text{Ni}^{2+}$ ；将其从树脂上剥离下来，使用这类螯合剂，可以将目的蛋白和  $\text{Ni}^{2+}$  以蛋白-金属离子复合物的形式共同洗脱下来。树脂由于失去了  $\text{Ni}^{2+}$ ，颜色变为白色，必须经过再生，重新离子化之后，方能再次用于蛋白纯化。

## 纯化真核表达体系来源的 His-Tag 融合蛋白

纯化真核表达体系表达出的 His-Tag 融合蛋白可能遇到某些特殊问题。为避免通过细胞裂解物进行蛋白纯化，实验者常希望目的蛋白能直接分泌至培养基中。用于培养酵母或昆虫细胞的培养基通常具有酸性的 pH 值，或含有供电子基团成分，会影响 His-Tag 融合蛋白与  $\text{Ni}^{2+}$  的结合。所以纯化前需要调整 pH 值，去除可能影响蛋白与树脂结合的组分（通过超滤或透析等方式）。建议使用 Ni-NTA 类型树脂。

哺乳动物细胞培养基常含有血清蛋白等添加物，血清蛋白能与树脂轻微结合，竞争 His-Tag 的结合位点。培养基中常常添加的 Gln、His 组分也有相似的作用。酵母、昆虫细胞或哺乳动物细胞的裂解物都可能含有影响蛋白结合步骤的杂质。在这些情况下，通常可采用酶活检测 (S-Tag™ Rapid Assay Kit 或 FRETworks™ S-Tag Assay Kit)，或使用 Western blots 检测等方法检测确定细胞粗提物或培养基中的 His-Tag 融合蛋白。在进行 His-Bind 亲和和纯化之前，先通过透析或超滤步骤除去影响目的蛋白结合的杂质。通过透析替换为合适的缓冲液体系

(pH8.0，合适的缓冲液组分)，通常有利于目的蛋白与树脂的结合。另外也可考虑凝胶排阻层析、离子交换等方法。

## His-Tag 融合标签的去除

很多情况下重组蛋白纯化后不需去除 His-Tag 融合标签。若实验者需要去除融合标签（如蛋白本身很小，标签相对来说是整个序列的一大部分），选择表达载体时需要考虑其蛋白酶切位点。Novagen 提供的多数 pET 载体都提供蛋白酶切位点（凝血酶、Xa 因子或肠激酶）。

Carboxypeptidase A (Calbiochem 货号 217285) 也可用于去除 C 端融合的 His-Tag 融合标签。这种酶可以有效去除蛋白 C 末端芳香氨基酸残基，直到遇到碱性氨基酸残基降解终止。

## 推荐参考资料

欢迎来信或来电向默克生化小组索取以下资料：

- Novagen 原版目录 2009-2010
- Novagen “pET 系统手册”（中英文版）
- 默克中国生化小组编辑印制的“蛋白质组研究工具产品手册”
- Novagen 或 Calbiochem 产品/试剂盒操作说明书（英文电子版）