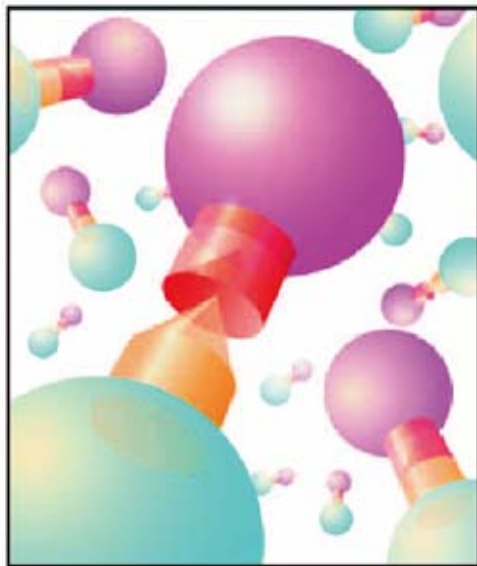


GE Healthcare



重组蛋白纯化手册

原理与方法



Handbooks from GE Healthcare



GST Gene Fusion System
Handbook
18-1157-58

Affinity Chromatography
Principles and Methods
18-1022-29

Antibody Purification
Handbook
18-1037-46

Percoll
Methodology and Applications
18-1115-69

**Ion Exchange Chromatography
& Chromatofocusing**
Principles and Methods
11-0004-21

**Purifying
Challenging Proteins**
Principles and Methods
28-9095-31

Gel Filtration
Principles and Methods
18-1022-18

**Recombinant Protein
Purification Handbook**
Principles and Methods
18-1142-75

Protein Purification
Handbook
18-1132-29

**Hydrophobic Interaction and
Reversed Phase Chromatography**
Principles and Methods
11-0012-69

2-D Electrophoresis
using immobilized pH gradients
Principles and Methods
80-6429-60

Microcarrier Cell Culture
Principles and Methods
18-1140-62

Challenging 蛋白质纯化的 原理与方法

目 录

简介	7
第一章：表达和样品的制备	11
表达系统的组成	11
样品制备	14
第二章：手动和自动纯化	21
有标签蛋白的简单纯化	21
手动纯化技术	21
用ÄKTADESIGN层析系统进行自动纯化	22
第三章：组氨酸标签蛋白的纯化	25
简介	25
表达	25
纯化总览	25
用NI SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE纯化蛋白	34
用NI SEPHAROSE 6 FAST FLOW进行纯化	38
使用HIS MULTITRAP HP和 HIS MULTITRAP FF 96孔过滤板进行高通量筛选	44
用HIS SPINTRAP小量制备	48
用HISTRAP HP和HISTRAP FF进行纯化	51
使用HISTRAPFF在ÄKTAPRIME PLUS上进行纯化	58
使用HISTRAP FF CRUDE从未净化的细胞裂解物中进行纯化	62
使用注射器和HISTRAP FF CRUDE试剂盒进行纯化	68
用HIS GRAVITRAP和HIS GRAVITRAP KIT进行重力流纯化	73
用HISPREP FF16/10进行规模化纯化	77
使用未装载金属离子的介质进行纯化	79
用IMAC SEPHARSOE HIGH PERFORMANCE进行纯化	81
用IMAC SEPHARSOE 6 FAST FLOW进行纯化	84
用HITRAP IMAC HP和HITRAP IMAC FF柱进行纯化	87
用HIPREP IMAC FF 16/10柱进行制备纯化	91
组氨酸标签蛋白的检测	94

用酶切的方法除去标签	97
问题解决	99
第四章：优化纯化组氨酸标签重组蛋白	103
简介	103
优化咪唑浓度	103
优化不同的金属离子	106
用多步纯化优化	109
第五章 GST标签蛋白的纯化	111
简介	111
表达	111
纯化	114
选择GST标签蛋白纯化的产品	115
纯化GST标签蛋白的基本要求	118
选择纯化设备	119
使用GLUTATHIONE SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE、GLUTATHIONE SEPHAROSE 4 FAST FLOW和 GLUTATHIONE SEPHAROSE 4B纯化蛋白	120
使用GST MULTITRAP FF和GST MULTITRAP 4B 96孔过滤板进行高通量筛选	127
用GST SPINTRAP纯化模块进行小量制备	132
用GSTRAP HP, GSTRAP FF和GSTRAP 4B柱子纯化	133
用GSTPREP FF 16/10柱进行制备性纯化	141
纯化方法的问题解决	145
GST标签蛋白的检测	148
检测方法的问题处理	151
用酶切的方法除去GST标签	153
酶切方法的问题解决	174
第六章 MBP标记的重组蛋白的纯化	176
使用MBPTrap HP柱子进行纯化	176
问题解答	186
第七章 Strep-tag II重组蛋白的纯化	188
使用StrepTactin Sepharose High Performance进行纯化	188

使用StrepTrap HP1毫升和5毫升的柱子进行纯化.....	191
问题解决.....	198
第八章 其它重组或天然蛋白的简单纯化.....	200
第九章 多步纯化标签和不带标签的重组蛋白.....	205
第十章 包涵体的处理.....	214
包涵体的溶解.....	214
溶解的重组蛋白的复性.....	215
问题解决.....	219
第十一章 脱盐和缓冲液更换.....	220
PD-10 DESALTING.....	222
HITRAP DESALTING.....	223
HIPREP 26/10 DESALTING.....	223
附录1 NI SEPHAROSE和未装载离子的IMAC SEPPHAROSE产品的特征.....	229
NI SEPHAROSE 产品.....	229
未装载离子的IMAC SEPHAROSE产品.....	237
附录2 GLUTATHIONE SEPHAROSE产品的特征.....	242
附录3 沉淀和重新溶解.....	247
附录4 填充和制备柱子.....	251
附录5 换算数据：蛋白、柱压.....	254
附录6 直线流速（CM/H）和体积流速（ML/MIN）之间的相互转换.....	255
附录7 GST载体.....	256
PGEX系列载体的比较区域.....	257
附录8 氨基酸表.....	258
附录9 不同纯化技术的原理和标准条件.....	259

简介

这本手册是为那些对于表达和纯化重组蛋白感兴趣的读者准备的。近年来，重组蛋白的应用有了显著增长，与此同时，用于表达和纯化重组蛋白技术和产品的应用也相应得以增长。用蛋白或多肽标签融合于重组蛋白中，进而方便重组蛋白的纯化和检验的优点已被广泛的认可。某些情况下，融合标签可以提高重组蛋白的稳定性和可溶性。

首先介绍给读者的是在决定表达宿主、载体、融合标签蛋白或无标签蛋白时需要考虑的初始因素，同时也包含一些成功进行蛋白表达的一般指导方针。此外，还有关于诸如收集、提取、处理包涵体，移除标签、除掉不需要的盐及小分子的建议。

重组蛋白的纯化可以手动或者用一套层析系统完成。层析系统可以手动操作也可以自动操作，以便节省时间和人力。纯化可以通过不同大小的层析柱在不同的量级进行。层析柱可以购买预先装好填料的预装柱或者购买空柱子手动填充。纯化也可以批量进行：用重力使其自然流出；用离心的方法通过SpinTrap™柱子来实现；或者用MultiTrap™产品在96孔板中进行。

蛋白依照它们自身性质的不同用层析技术分离，如图1所示。融合标签使重组蛋白能够用亲和和层析获得纯化，这种层析技术是基于能够捕获融合标签的方法而设计的。这样，一些不同的重组蛋白如果具有相同的亲和标签就能够通过相同的亲和层析方法获得纯化。同样，亲和标签可以使不同的重组蛋白使用同样的检测方法检测。这样，带有亲和标签的蛋白可以简单方便的操作，在很多情况下，这些蛋白可以用商品化的层析柱仅通过一步纯化得到。表达、纯化和检测通常使用的组氨酸标签以及GST标签融合蛋白的方法在特定的章节中讲述。纯化组氨酸标签蛋白的大体流程如图2所示。此外，用单步亲和层析成功纯化无标签重组蛋白的建议也在本手册中有所提及。无论对于有标签蛋白或无标签蛋白，当有更高级别纯度的要求时，多步纯化就成为必需。如果正确选择了所用纯化技术的组合，那么高纯度就变得简单了。

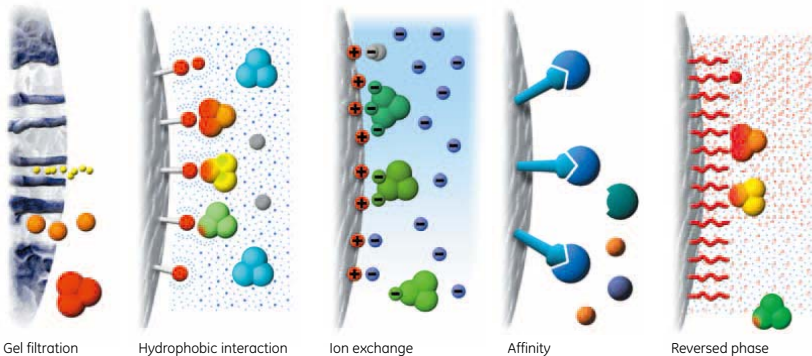


图1：层析技术纯化分离原理。

总之，这本手册目的在于帮助读者能够纯化到其感兴趣的重组蛋白，并且满足特定应用所需的数量及质量。重组蛋白的质量可以通过它的折叠及生物活性反映出来。

通用缩略语

A280: 在特定的波长下的紫外吸收（在本例中，是在280纳米的紫外吸收）

AC: 亲和层析

BCA: bicinchoninic acid

CDNB: 1-chloro-2,4-dinitrobenzene

CF: 层析聚焦

CV: 柱体积

DAB: 3,3' -diaminobenzidine

DNase: 脱氧核糖核酸酶

ELISA: 酶联免疫吸附检测

FF: 快速流

Gua-HCl: 盐酸胍

GF: 凝胶过滤

GST: 谷胱甘肽硫转移酶

HIC: 疏水作用层析

HMW: 高分子量

HP: 高效

HRP: 辣根过氧化物酶

IEX: 离子交换层析

IMAC: 固定化金属离子亲和层析

IPTG: 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷

LMW: 低分子量

MPa: 兆帕

Mr: 相对分子量

N/m: 用每米的理论塔板表示的柱效

PBS: 磷酸盐缓冲液

pI: 等电点。使蛋白表面电荷为零的pH值

psi: 磅每平方英尺

PMSF: 苯甲基磺酰氟

PVDF: 聚偏氟乙烯

r: 重组，比如rGST, rBCA

RNase: 核糖核酸酶

RPC: 反相层析

SDS: 十二烷基磺酸钠

SDS-PAGE: 十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳

TCEP: 三(2-羧乙基)膦化氢盐酸盐

符号



这个符号表示对提高效率或者在特别情况下建议采取的行动



这个符号表示请执行的建议，并且警告需要格外小心



这个符号高亮显示解决问题的建议，用来帮助分析和解决疑难杂症



高亮显示化合物、缓冲液和设备



标出实验操作方案

General purification of histidine-tagged proteins

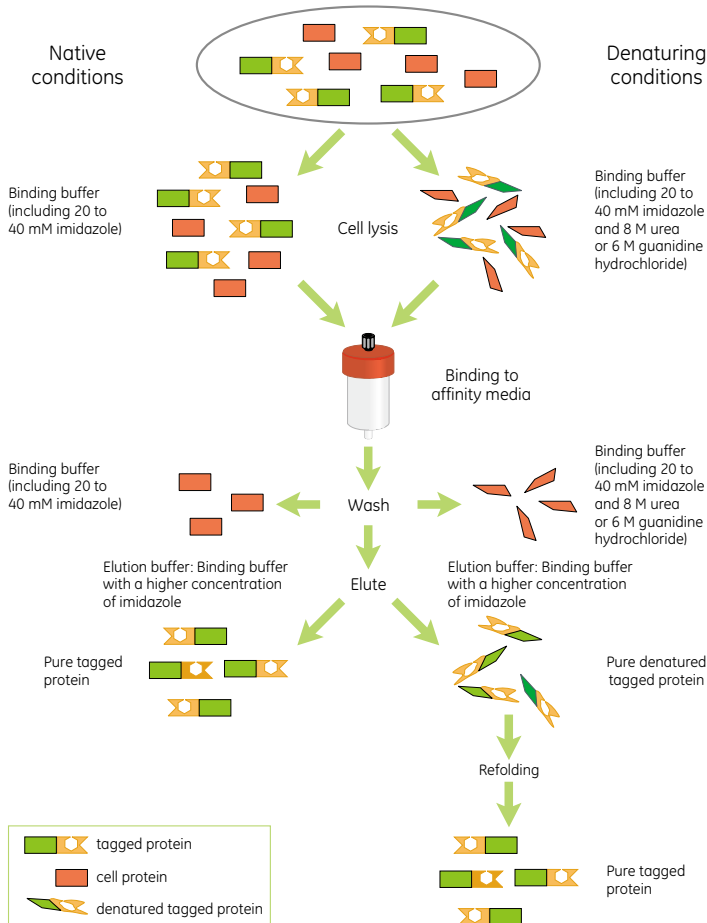


Fig 2. General purification workflow for histidine-tagged proteins (assumes use of Ni^{2+} -charged affinity media, but other metal-ion-charged media follow the same workflow).

图2：纯化组氨酸标签蛋白的通用流程图。（假设使用的是镍离子亲和层析，但其它金属离子层析采用同样的流程）

第一章：表达和样品的制备

表达系统的组成

一个蛋白质表达系统包括：一个具有合适启动子、其它调控序列以及编码所需重组蛋白的基因的载体，以及一些其它组成部分。用于表达具有融合标签蛋白或者无标签蛋白的载体都有商品化的产品。这些表达载体被设计成带有适合特定宿主（比如大肠杆菌或哺乳动物细胞）的调控区域，也被设计成适合特定的表达类型。它们所具有的抗性标记基因使得选择正确的克隆变得简单易行。根据特定的需求，重组蛋白可以持续表达或者诱导表达，也可以进行表达量的高低调节。载体的选择很重要，因为这可以影响到克隆后的很多步骤，包括表达、蛋白处理、纯化。构建完成的载体可以被应用于原核生物、真核生物、组织或细胞系来表达具有科研或工业重要价值的重组蛋白。重组蛋白可能需要检测、定量或者纯化。选择合适的表达系统依赖于生产蛋白的规模、时间、可用的资源以及重组蛋白的用途。一些可供选择的表达系统都可能适合。

宿主的选择

许多宿主表达系统都可使用，其中包括细菌、酵母、植物、丝状真菌、昆虫或哺乳动物细胞培养物、转基因动物或植物。每种宿主系统都有它的优点和缺点。因此，对宿主的最终选择需要认真地考虑。

宿主的选择不仅影响蛋白的表达，而且也影响产品的随后纯化。为了决定哪种宿主最为合适，所需产品的量、纯度等级、生物完整性、潜在的毒性都要考虑。比如：如果蛋白需要翻译后修饰才能具有完整的功能，那么大肠杆菌系统就不适合表达这种重组产品。表1总结了集中表达系统的特点。

表1：几种表达系统的特点

对蛋白的处理	细菌	酵母	昆虫细胞	哺乳动物细胞
包涵体	+/-	(+) /-	-	-
分泌	+/-	+1	+	+
糖基化	-	+2	+	+
蛋白酶切	+/-	+/-	-	-
其它翻译后修饰	-	+3	+	+

+=有

-=无

- 1 通常会构建允许蛋白分泌的表达质粒，这样可以避免对细胞裂解的需求。与细菌相比，酵母细胞裂解需要更强大的方法。
- 2 酵母比昆虫细胞和哺乳动物细胞都具有更广泛的糖基化修饰。这是在酵母中外源表达蛋白的缺点之一。
- 3 酵母缺少一些在高等真核生物中的翻译后修饰。

重组蛋白产品在宿主内的定位也会影响分离和纯化该产品所用方法的选择。比如，除了在细胞

质内表达蛋白，细菌宿主可以把蛋白分泌到培养基中、转运到周质空间中、在细胞内以包涵体的形式储存起来（图3）。蛋白在细胞不同部位的表达可以导致为了获得纯蛋白而需要除去的杂蛋白种类及数量上的差异。

这本手册的主要着眼于从细菌来源纯化可溶蛋白，这也是最通用的系统。纯化包涵体中的蛋白也会有所讨论（见第8章）。

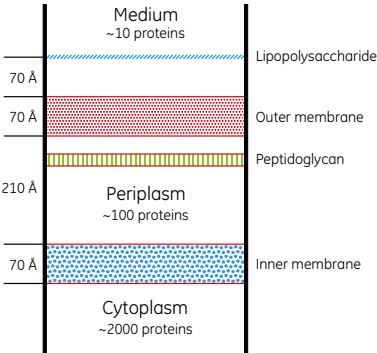


图3：大肠杆菌细胞壁横切面示意图，以及蛋白种类的典型分布

载体选择

载体家族的选择主要受限于宿主的选择。一旦宿主被确定，有许多不同的载体可供后续选择，比如从简单的表达载体到那些含有特定序列从而能使重组蛋白分泌出去的载体。为了把感兴趣的基因克隆进载体，所有改造好的载体都在转录启动子序列后包含有一些选好的单酶切位点。最近克隆技术的发展又在宿主和载体选择方面提供了更大的柔性，比如把感兴趣的DNA序列插入到多种表达载体中。

将重组蛋白与一个已知大小和生物学功能的标签融合可以极大地方便后续的纯化和表达过程（比如开发表达方法和纯化）。某些情况下，蛋白的产量也会有所提高。表2总结了一些有标签蛋白的表达、纯化和检测特点，这些或许会影响载体的最终选择。

表2：有标签和无标签蛋白表达的优缺点。

	优点	缺点
标签蛋白	可以提高可溶性和稳定性 蛋白的位置信息可以编码在标签中 提供了表达的标志 用亲和层析可以进行简单的纯化。通常，两步纯化方案可以用于实验室生产平台的纯化。检测标签，而不是检测目的蛋白，因而可以采用通用的检测方法，例如应用于结构生物学研究的蛋白生产平台。	标签可能会对蛋白的结构、折叠和生物活性有所影响 如果需要移除标签，酶切效率通常不会达到100%，而且有时会有些氨基酸残余

无标签蛋白	不需要移除标签	纯化和检测并不简单 可溶性和稳定性的问题可能较难克服， 降低了潜在的产量。
-------	---------	---

1 用于酶切的蛋白酶效率可能会由于一些物质的影响而降低。比如在蛋白制备过程中的去垢剂或不合适的酶切条件。

标签的选择

最常用的两种标签是六组氨酸标签和GST标签。其它由4-10个组氨酸残基构成的多组氨酸标签也被使用，尤其是如果纯化方面有特别需求，它们可以作为六组氨酸标签实用的替换者。正如同宿主和载体的选择一样，选择组氨酸标签或GST标签必须依照特定应用的需求来决定。表3突出显示了这两种标签需要被考虑到的一些重要特性。

表3：标签的选择

组氨酸标签	GST标签
可以在任何表达系统中使用。	可以在任何表达系统中使用。
纯化过程可以生产出高产量的纯产品。	纯化过程可以生产出高产量的纯产品。GST标签可能也会提高表达蛋白的可溶性。
用于纯化的产品可以在任何规模上选择。	用于纯化的产品可以在任何规模上选择。
不需要除掉小标签（例如，由于标签的免疫原性弱，因此可以把融合蛋白直接作为抗体制备中的抗原使用）。必要时使用TEV蛋白酶来切掉组氨酸标签。 注：肠激酶位点可以使酶切后不留下多余的氨基酸。	位点特异性的蛋白酶（PreScission™ Protease）可以在40℃高特异地进行切割。而且这种蛋白酶也很容易被除去，因为它自身也带有GST标签（见第5章）。
组氨酸标签可方便地用免疫方法检测。	GST标签可方便地用酶或免疫方法检测。
纯化简单。 如果需要，纯化可以在变性条件下进行。可以柱上复性。 注：少数情况下，咪唑可以导致沉淀。这时需要通过更换缓冲液除去咪唑。	纯化简单。非常温和的洗脱条件使目的蛋白的功能和免疫原性受到破坏的风险最小。可能需要更换缓冲液以除去还原型谷胱甘肽。
组氨酸-二氢叶酸还原酶标签会在表达时稳定小肽。	GST标签能够帮助重组蛋白稳定折叠。
小标签对于融合目的蛋白的结构和功能的影响相对较小。	标签蛋白可能会形成二聚体。

GE Healthcare提供了多种用于纯化组氨酸标签和GST标签融合蛋白的解决方案。第三到五章会在细节上的讨论这些解决方案。GE Healthcare也提供了其它标签蛋白的纯化解方案，包括钙调素结合肽标签、蛋白A标签、生物素化肽标签。融合于钙调素结合肽标签的重组蛋白可以通过钙调素-Sepharose™ 4B纯化，蛋白A标签蛋白可以通过IgG Sepharose Fast Flow纯化，生物素化肽标签蛋白可以通过HiTrap™ Streptavidin HP柱子或Strepsavidin Sepharose High Performance获得纯化。

样品制备

优化表达标签蛋白的关键是能够用许多克隆的粗裂解物进行筛选，从而确定最优的表达水平和培养条件。这可以用预装的96孔板，His MultiTrap HP和 His MultiTrap FF或GST MultiTrap 4B和GST MultiTrap FF来实现（见第3章和第5章）。一旦条件确定，研究者即可准备大规模培养所需克隆。样品随后被处理并准备用于纯化。用于纯化有标签蛋白有多种不同的方法可供使用，这些方法的选择取决于表达系统（宿主和载体）以及所使用的标签。样品制备的流程如图4所示。

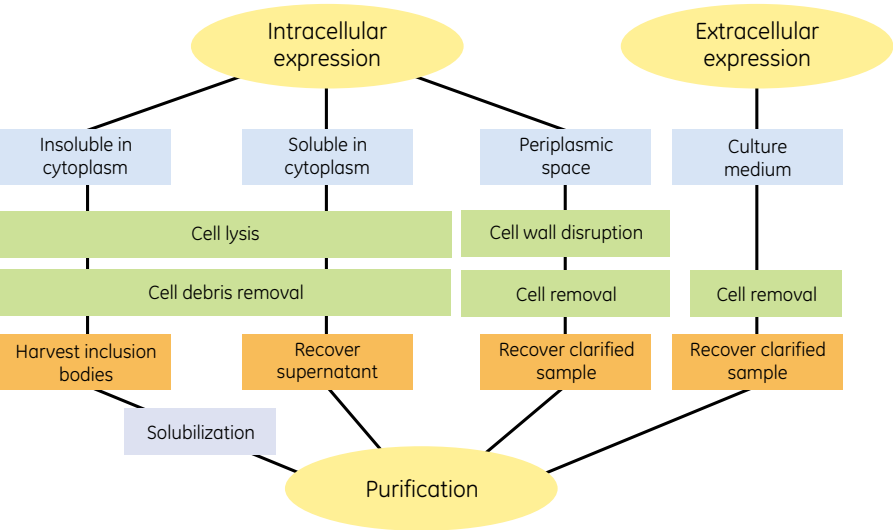


图4：样品制备流程图

重组蛋白的产量相差很大，并且受标签蛋白的性质、宿主细胞、培养条件影响。重组蛋白的产量在0-10mg/l之间变化。表4可以被用作估计培养体积（按照平均2.5mg/l的产量计算）。

表4：重组蛋白的产量

蛋白	12.5 μ g	50 μ g	1mg	10mg	50mg
培养体积	5ml	20ml	400ml	4l	20l
裂解体积	0.5ml	1ml	20ml	200ml	1000ml

对于特定样品的制备步骤，组氨酸标签蛋白的样品制备过程见第3章。GST标签蛋白的制备过程见第5章。

细胞收集及提取

细胞收集和提取程序要依照蛋白的来源，比如是细菌、植物还是哺乳动物来源，胞内还是胞外来进行选择。收集就是把细胞和细胞培养基分离的过程，主要包括离心或者过滤工艺。这需要依照目的蛋白的来源参照标准的实验流程来定制合适的方法。

提取技术的选择依赖于仪器条件以及在特定样品类型的操作规模。通用的重组蛋白提取过程如表5所示。许多情况下，研究者可以选择这些方法的组合来获得最优的结果。

表5：通用的重组蛋白提取过程

	提取方法	典型条件	评论
温和	渗透压法裂解细胞	2倍体积水和1倍体积压实的清洗过的细胞。	产量低，但是释放的蛋白酶少。
	酶消化	0.2mg/ml溶菌酶在37oC温育15分钟。	实验室规模。通常和机械裂解联合使用。
中等温和	用研磨料进行研磨，比如玻璃珠	向预清洗的细胞加入玻璃珠，漩涡振荡，离心，重复5次，收集上清。	机械方法。化学条件对于细胞裂解并不重要，但是对于随后的移除细胞碎片和纯化步骤很重要。
	冻融	冰冻细胞，化冻，在室温用移液器或温和的漩涡振荡，使用裂解缓冲液重悬细胞体沉淀。离心，保留上清。参照仪器说明书。	需要若干循环。
剧烈	超声或者高速研磨		规模小。释放的核酸可能会导致粘稠问题（可以加入DNase来降低黏度）。包涵体必须重新溶解。
	Manton-Gaulin匀浆器	参照仪器说明书。	大规模。
	French Press	参照仪器说明书。	实验室规模。
	分级沉淀	参见附录3。	沉淀必须被重悬。

细胞裂解的结果取决于几个因素：包括样品的体积，细胞浓度、时间、温度、能量输入（搅拌速度、压力等）以及细胞裂解设备的物理性质。

 尽可能使用温柔的方法，因为太剧烈的细胞或组织破碎可以导致目的蛋白变性或者蛋白酶释放以及酸化。

 提取应尽可能迅速，在低于环境温度、有合适的缓冲液稳定pH值及离子强度等使样品稳定的条件下进行。



核酸的释放可能会导致粘稠（加入DNA酶可以降低粘稠度）。蛋白酶抑制剂经常需要被用来减少蛋白在提取过程中的降解。分级沉淀（见附录3）可以减少蛋白酶。



在细菌和酵母表达系统中，重组蛋白可能经常存在于包涵体中。提取过程包括包涵体的溶解，这一般在变性剂存在的条件下进行，然后在纯化前或纯化后进行复性，详见第8章。

层析纯化的准备

用于层析纯化的样品应该是澄清的，并且没有颗粒物。在层析前，净化样品的简单步骤可以避免堵塞柱子，减少强力清洗柱材的过程，并且能延长柱材的使用寿命。这条规则的一个例外是使用HisTrap™ FF粗柱或试剂盒，His GraviTrap™ 柱，His MultiTrap产品来纯化聚组氨酸标签蛋白（在第3章讨论）以及用GST MultiTrap产品来纯化GST标签蛋白（在第5章讨论）。使用任意以上产品可以不用净化样品，并会提高纯化过程的速度。这一方法可以保护蛋白活性，对于纯化敏感蛋白非常重要。

为层析纯化准备样品需要考虑的主要参数包括：

- 净化样品（除了上述的粗柱、GraviTrap柱和MultiTrap产品）
- 稳定目的蛋白（蛋白酶抑制剂、pH值、离子状态、还原剂、用于稳定蛋白的添加剂等）
- 层析纯化合适的工作条件（主要吸附、优化目的蛋白结合、使杂蛋白结合尽可能少）
- 可使用的仪器
- 可操作及方便性（样品大小、过滤/离心设备等）

蛋白稳定性

多数案例中，纯化后蛋白的生物活性仍需保留。在纯化过程中，保持目的分子的生物活性也是一个优势，因为目的分子的检测通常依赖于它的生物学活性。样品组分的变性通常导致沉淀或者非特异吸附的增强，这两种情况都会降低柱子的功能。因此，最好检测样品的稳定极限并且在纯化过程中不超出这些极限。

蛋白质通常具有很高程度的四级结构，并且由范德华力、离子相互作用、疏水相互作用以及氢键来维持。任何能够减弱这些力的条件都有可能导致蛋白的变性或沉淀。相比之下，多肽则有很低的四级结构，它们的天然构象由二级结构主导，并且主要由氢键来稳定。由于这个原因，多肽能够比蛋白忍受更广泛的条件。这种在天然构象方面的基本差别还反映在蛋白不容易复性而多肽通常能够自发地复性。蛋白四级结构和蛋白质复合物可能对成功进行蛋白纯化提出额外的挑战。蛋白质复合物通常由弱相互作用结合在一起，因此需要温和的纯化条件并且可能需要去除不完全的复合物形式。一些蛋白需要辅酶或辅助因子才能有活性，膜蛋白需要它们所在细胞膜的天然环境中的脂类分子才能稳定其天然构象。

在开始发展一个纯化方法前，最好进行稳定性检验，下面列出的清单可作为这类检验的基础：

- 以1个pH单位为步长，在pH 2-pH9之间检验蛋白对pH变化的稳定性。
- 以0.5M为步长，在0-2M 氯化钠 和0-2M (NH₄)₂SO₄之间（包括缓冲试剂）检验蛋白对盐浓度变化的稳定性。
- 以10oC为步长，在4oC和40oC之间检验蛋白对温度变化的稳定性。至少要首先在冷室和室温（22oC）检测。
- 通过把部分样品在室温放置过夜，检测蛋白的稳定性以及被蛋白酶降解的活力。离心样品，如果可能的话测量离心后上清中的活力和280nm的紫外吸收。通过SDS-PAGE电泳来检查目的蛋白的大小。有时用紫外-可见光谱扫描（190-800nm）会比较有效（比如对细胞色素等蛋白），因为蛋白的天然光谱需要蛋白的天然构象。

样品净化

-  离心和过滤是净化样品的标准技术，并且在处理小量样品时经常使用。强烈建议在层析纯化前离心或者过滤任何样品，除非使用HisTrap FF粗柱或试剂盒、His GraviTrap 柱、His MultiTrap产品来纯化组氨酸标签蛋白（在第3章讨论）以及用GST MultiTrap产品来纯化GST标签蛋白（在第5章讨论）。
-  已经净化过的样品如果不能立即使用则可能在几分钟内开始沉淀，如果这样的话，建议再次净化。
-  建议直到使用前，一直把样品放在冰上，即使是在室温进行纯化。

离心

离心能够除去大部分的块状物，比如细胞碎片。如果离心后样品仍然不清澈，则需用滤纸或者5 μ m的滤膜作为第一步过滤，用表6中列出的滤膜作为第二步过滤。

-  对于小体积样品或者容易吸附在滤膜上的样品，10000g离心15min。
-  对于细胞破碎物，40000-50000g离心30min。（如果速度足够高，可以把时间降低至10到15min）。
-  血清样品可以在离心后通过玻璃纤维进行过滤，以除去残留的脂类。
-  使用离心机的冷冻功能，在冷室中储存转子（或者在离心机中提前预冷转子）。

过滤

过滤能够出去块状物质。由醋酸纤维素或PVDF材料制成的滤膜能够非特异性结合最少量的蛋白。在层析前的样品准备过程中，需要选择一个孔径和层析柱材介质相对应的滤膜（见表6）

表6：选择滤膜的孔径

通常孔径的滤膜	层析介质的颗粒大小
1 μm	90 μm 或更大
0.45 μm	30或34 μm
0.22 μm	3, 10, 15 μm 或者当需要额外清洁样品或过滤灭菌时



试跑一次柱子以确定蛋白的回收率。有些蛋白可能非特异的结合在滤膜上。



滤膜“饱和”--即滤膜具有一定的容量。在确定实验方案前需要检查一下滤膜的容量。

脱盐和更换缓冲液

脱盐柱适合多种不同的样品体积，并且能够快速地在一步中除去低分子量的杂质，同时将样品转移到正确的缓冲液环境中。如果脱盐是层析的第一步，则需要净化样品。建议在脱盐前离心和（或）过滤样品。更换缓冲液和脱盐的详细步骤会在第9章中讲述。

透析和离心超滤/浓缩也是脱盐和（或）更换缓冲液的另一种办法，但使用脱盐柱的实验速度使它成为诱人的选择。



有时仅仅简单的用一些方法就可以达到变化条件的目的，比如稀释（降低离子强度）、加入试剂[为使用疏水作用层析（HIC）而增加硫酸铵的浓度]或滴定来达到所需pH值。

在实验室规模上，如果过滤或离心后的样品已经足够澄清，更换缓冲液或脱盐步骤可以省略。对于亲和层析或者离子交换层析，调节样品的pH值就已经足够了，必要时还需要调节样品的离子强度。



脱盐能够快速的处理小量或者大量体积的样品，需要时可在纯化步骤前及纯化步骤间使用（注意额外的步骤会降低产率，脱盐也会稀释样品）。



脱盐能够除去相对分子量大于5000的蛋白中的盐。



如果需要挥发性的缓冲液，使用100mM的醋酸铵或100mM的碳酸氢铵。

检测和定量

优化纯化实验方案时需要对目的蛋白进行检测和定量。对于过量表达的蛋白而言，它自身的高浓度就可以用来在层析过程中检测目的蛋白。但是在这种情况下，在制备的最后一步仍需要对蛋白的身份进行验证。特异的检验有标签蛋白的方法可以通过活力或免疫方法检验标签的存在，或者简单地测定标签的光谱学性质。当带有同一标签的很多表达克隆用高通量平台构建好后，特异性的标签检验方法就显得尤为重要。特异性检验目的蛋白可以通过功能检测、免疫检验、质谱的方法来实现。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）是检验蛋白纯度的关键方法。

目的蛋白条带的表观分子量可以通过比对同时分析的分子量标准进行确定，随后有关蛋白身份的验证也应该能得到。优化纯化蛋白实验方案也需要功能检测来评估目的蛋白的完整性。特异性检验组氨酸标签和GST标签蛋白的方法在第3章和第5章分别讨论。总体上：

- 有标签蛋白的相对产量经常可以通过测量在280nm的紫外吸收得到（适用于组氨酸标签和GST标签蛋白），因为在一步纯化后的纯度很高，大多洗脱下来的蛋白都可以认为是目的蛋白。这时需要目的蛋白的摩尔吸光系数，它可以通过氨基酸组成进行理论计算得到。
- 蛋白的产量也可以通过标准的显色方法得到（比如Lowry法，BCATM蛋白测定法，Bradford法等）。
-
- 如果可以制定一个标准曲线，用免疫分析也可给蛋白定量。这种情况下，只要有纯蛋白作为标准，就不需要纯化标签蛋白。因此，这些技术可以用来在开发实验方案时定量。当仅需要一个简单的有或没有的答案时，免疫分析技术也可以用来筛选很多样品（如从层析运行中测试组分）。
-

蛋白表达的评估

低于最优水平的目的蛋白表达可以根据问题产生的原因通过不同的方法进行改进。如果在提取物中没检测到目的蛋白，则可能意味着插入片段被克隆进了一个错误的开放阅读框中。确保编码蛋白的DNA序列被克隆到载体上合适的开放阅读框是很重要的。确定插入片段是在正确的开放阅读框内的最好办法是在克隆连接处测序。

目的蛋白的产量低则可能是表达时的培养条件没有得到优化。这时需要检查细胞系的影响、培养基的组成、培养温度、诱导条件。提取条件对不同的标签蛋白会有所不同。

在大肠杆菌系统中，分析一小部分过夜培养物，比如用SDS-PAGE的方法，如果可能的话也可以用活力测定法。

一般来讲，当诱导后的培养物600nm的吸光达到1时，如果把5-10 μ l培养物上样到胶孔中，一个高表达量的蛋白就可以通过考马斯亮蓝看见。没有转化的大肠杆菌和转化了空载体的大肠杆菌应该平行进行电泳，分别用来做阴性对照和阳性对照。

一个蛋白在全部细胞提取物中存在而不在净化后的裂解物中存在可能表示它存在于包涵体中。用光学显微镜检查包涵体，它们通常以浓缩的斑点形式存在于细胞中。处理包涵体的具体信息参见第8章。

用免疫印迹的方法检测蛋白表达也值得一试。把诱导的细胞跑SDS-PAGE，将蛋白转移到硝酸纤维素或者PVDF膜上（比如HybondTM-C或Hybond-P），用抗组氨酸或抗GST，或直接抗目的蛋白的抗体进行检测。有些标签蛋白在SDS-PAGE上可能会被细菌中分子量近似的蛋白掩盖，这时就可以用免疫印迹检测这些蛋白。

如果目的蛋白在裂解后的沉淀里，要想办法进行富集。另一种选择是把产品分泌出去或加一个有稳定作用的标签。

如果目的蛋白吸附在细胞碎片上，尝试用不同的离子强度或pH值使其解离。

有时可能观察到较高的基础表达水平，这可能本身就是一个问题（比如当要表达的蛋白有毒时需要考虑）。这可能由于启动子泄露造成的。不同的载体系统依赖于不同的组成型或可诱导的启动子，因此，解决此类问题的最简单的方法就是尝试另一个表达系统。这也可能是由于表达载体和表达宿主不兼容造成的，更换另一个载体或者宿主应该能够减轻这个问题。

细胞生长过程中可能会对重组蛋白产生不同的修饰，这些也可能影响表达水平。这些修饰包括聚集、错误折叠和形成随机的二硫键、天冬酰胺和谷氨酰胺的脱氨基作用、甲硫氨酸的氧化、蛋白水解酶酶切和其它一些如糖基化、磷酸化、乙酰化修饰。这些修饰的讨论超出了本手册的范围，但是减少或者去除这类问题的简单方法就是检查细胞株、培养基成分、培养温度、诱导条件的影响。对于每个标签蛋白来讲，正确的条件可能不同。

表7中总结了用来鉴定一个重组蛋白是否正确的表达的分析工具。

表7：评估蛋白表达的分析工具

分析工具	被评估的性质
SDS-PAGE和免疫印迹	大小，蛋白酶切割
非变性电泳，等电聚焦	聚集，非均一性
检测生物活性	在不同的pH、离子强度、蛋白浓度、去垢剂浓度下的稳定性
N端测序	非均一的N端
质谱	大小，序列非均一度，翻译后修饰的不均一度，氨基酸残基的化学修饰
C端测序（在专门实验室才能进行的困难方法）	截短形式

第二章：手动和自动纯化

科研和工业目的所需求的重组蛋白在质上（比如具有天然结构或变性的）和量上（从毫克级到克级）都有所不同。人们需要选择一个纯化方法来生产能够达到所需量和质的蛋白。需要纯化的蛋白的数量同样值得慎重考虑。购买一套层析系统可能会节省宝贵的时间以及蛋白样品。

有标签蛋白的简单纯化

当重组蛋白和多肽标签或蛋白标签（比如组氨酸标签或GST标签）融合时，标签的性质就可以被充分利用以纯化融合蛋白。每种通常使用的标签都开发出了相应的亲和层析方法，于是就有很好的机会可以仅用单独一步就成功地进行蛋白纯化。

手动纯化技术

对于标签蛋白的小规模纯化，一步单独的亲和层析并用简单的逐步洗脱通常就足够了。手动纯化可以成批进行或者用重力流、离心柱或96孔板进行。

用批量方法纯化标签蛋白时，蛋白样品通常加入一个内置有柱材的一次性塑料管中，然后柱材被洗涤，标签蛋白被洗脱。批量方法适合小规模纯化。

标签蛋白也可以通过简单的流过一个内置有合适柱材的一次性柱子来纯化。有特意为重力流而设计的柱子，比如为组氨酸标签蛋白设计的 His GraviTrap。一个1ml的His GraviTrap柱能够纯化大约40mg组氨酸标签蛋白。此外，还有HiTrap柱子适合用注射器或蠕动泵来纯化组氨酸标签或GST标签融合蛋白（分别是HisTrap和GSTrapTM柱）。大体上来讲，HisTrap柱的结合能力是每ml柱材至少能结合40mg蛋白。HiTrap柱也可以连接到ÄKTA designTM层析系统上（见本章下一节）。HiTrap柱很容易进行不同的连接，因为随柱附带了所有需要的接头。

当纯化可以在表达筛选的小规模水平上进行时，96孔板或预装的离心柱就很方便了。对于组氨酸标签和GST标签融合蛋白都有预装柱材的96孔板（MultiTrap）。样品被移液到预装好的板子的孔中，用离心或者真空的方法洗涤和洗脱。每孔的载量是最多1mg组氨酸标签蛋白（His MultiTrap）和0.5mg GST标签蛋白（GST MultiTrap）。用这种板子可以同时处理96个样品，当需要处理很多板子时，可以用机器人系统来操作。

预装的离心柱（SpinTrap）被设计用在小离心机中使用，并且提供了与使用96孔板筛选不同的选择。His SpinTrap被设计用于快速纯化和筛选组氨酸标签蛋白，每个柱子的载量是大概750 μ g 组氨酸标签蛋白。GST SpinTrap纯化模块包含有预装的离心柱，每根柱子能够纯化不超过400 μ g 的GST标签蛋白。

用ÄKTAdesign层析系统进行自动纯化

当实验结果的可重复性很重要，并且手动纯化太费时而又低效时，就应该使用层析系统。当需要进行不断的重复性劳动来获得足够的纯样品或者处理大体积样品或多种不同样品时，手动纯化的效率会比较低。此外，使用层析系统还可以提高蛋白分离的质量和可重复性。由于层析系统可以自动监测纯化过程，因而可以提供比手动纯化更多的控制。层析系统强健并且使用方便，不仅可以进行简单的逐步洗脱，而且还能用精确控制的线性梯度洗脱来提供高分辨率的分离效果。它们使用现代的柱材而达到高流速。如下是适合纯化标签蛋白的ÄKTAdesign层析系统的使用简介。

ÄKTaprime™ plus（图5）是一套经济而且简单易学的层析系统，可以用来纯化标签蛋白。通过按键操作，它可以提供简单的单步蛋白纯化。这套系统包括预先编好的用以纯化组氨酸标签蛋白和GST标签蛋白的方法。事实上，对于任何的HiTrap柱，都有预先编好的方法。此外重组蛋白的回收率也通常高于手动纯化同一蛋白。采用优化好的纯化方案和预装柱，产率和纯度都高度稳定。如果采用合适的柱子，标签蛋白能够在ÄKTaprime系统中通过一步层析获得纯化，产量在毫克到克级别。



图5：ÄKTaprime plus层析系统



图6：ÄKTaexplorer层析系统

标签蛋白的纯化也可以在更先进的层析系统中进行。ÄKTaexplorer™（图6）是一个能够自动的通过一个纯化步骤纯化多个样品（最多8个）的系统。这是非常方便的，因为不需要不同样品间的手动操作。同ÄKTaprime plus一样，ÄKTaexplorer也可以简单的纯化毫克到克量级的蛋白。

ÄKTAexplorer所带来的另一个优势是可以自动地用多种层析技术纯化多个样品，该功能需要额外附加的ÄKTATM 3D plus Kit。当单独的亲和层析步骤不能达到特定应用所需纯度，或者交换缓冲液抑或进一步纯化需要在亲和层析后进行时，使用多于一个单独的层析步骤就显得非常重要。使用ÄKTATM 3D plus Kit以及ÄKTAexplorer 100，最多6个样品能够自动在一次运行中纯化完毕，其中的纯化步骤包括一步或两步。当选择了三步纯化方案时，最多可以纯化4个样品。通常亲和层析（AC）是第一步，有些纯化方案有第二步纯化，凝胶过滤层析（GF）或者离子交换层析（IEX）。为了额外的方便和可重复性，纯化方案采用推荐的预装柱。这个系统可以为每个样品生产最多50mg蛋白，其纯度在90%以上。这些蛋白可以应用于结构和功能研究或药物靶点筛选。

当需要更高的自动化程度时，建议使用ÄKTExpress™（图7）。ÄKTExpress是一个模块化系统（由一台计算机控制的1个到12个模块）。它可以自动的并行处理最多48个标签蛋白，纯化方案最多可以到4步。纯化方案可以以亲和层析开始，然后是其它的纯化步骤，如脱盐、离子交换层析、凝胶过滤层析。此外，自动的柱上酶切或溶液中酶切也可以整合到纯化方案中。所有的模块都可以使用同一个纯化方案，也可以独立进行工作。纯化方案采用预装柱，并可以纯化最多50mg的标签蛋白，纯度在95%以上。这些纯化过的样品适合结构生物学研究。



图7：四个模块组成的ÄKTExpress层析系统。

还有其它一些ÄKTAdesign层析系统也可以用来纯化标签蛋白。标准化的ÄKTAdesign配置如图8。更详细的有关纯化组氨酸标签蛋白的方法在第3章和第4章讨论，有关GST标签蛋白的纯化方法在第5章讨论。

表8：使用标准化ÄKTAdesign配置的方法

工作方法	标准的ÄKTAdesign配置						
	ÄKTA prime plus	ÄKTA purifier	ÄKTA explorer	ÄKTA xpress	ÄKTA pilot	ÄKTA crossflow	ÄKTA proess
制造和生产					●		●
UNICORNTM软件		●	●	●	●	●	●
简单的单步纯化	●			●			
通常纯化所需的可重复性	●	●	●	●	●	●	●
调节所需的系统控制和数据处理		●	●	●	●	●	●
自动方法开发和优化		●	●		●	●	
自动的缓冲液制备		●	●				
自动的pH监测		●	●				
自动的介质或柱子监测			●		●		
自动的多步纯化			●	●			
方法开发并规模化放大			●		●	●	
清洁设计cGMP					●	●	●
规模化放大，过程开发，转移到生产					●	●	



图8：标准化的ÄKTAdesign系统配置。

第三章：组氨酸标签蛋白的纯化

简介

组氨酸标签蛋白对Ni²⁺及其它一些金属离子有高选择性的亲和力，这些金属离子能够用螯合配体固定在层析介质上。因此带有组氨酸标签的蛋白能够选择性结合在装配了金属离子的柱材上，如Ni Sepharose High Performance (HP) 和Ni sepharose 6 Fast Flow (FF)，而其它的细胞蛋白则不能结合或仅能微弱结合。这种层析技术经常被称为固定化金属离子亲和层析 (IMAC)。一般而言，组氨酸标签蛋白是在粗提物（比如细菌裂解物）中与柱子结合能力最强的蛋白。真核细胞的提取物中通常会有较多的蛋白能够结合柱子。而且与其他标签相比，组氨酸标签较小，通常不易破坏和它们融合的蛋白的结构。因此移除标签通常并不重要。

大肠杆菌中表达的组氨酸标签蛋白主要以两种形式富集：有生物学功能的可溶蛋白或者包涵体。包涵体是变性蛋白或者部分变性蛋白组成的不溶聚集体，不具备生物学活性，但通常使重组蛋白的产量很高。为恢复以包涵体形式表达的蛋白的生物学活性，有必要进行包涵体的溶解、蛋白复性和纯化。这个话题将在第8章讨论。

表达

如何表达标签蛋白，包括选择载体和宿主时需要考虑的因素已经在第1章有所讨论。

纯化总览

图9给出了纯化组氨酸标签蛋白的经典纯化流程，其中包括在变性条件下纯化蛋白。柱上复性并纯化组氨酸标签蛋白在第8章也有讨论。

简单起见，有一系列的产品可供选择用来进一步纯化组氨酸标签蛋白，以满足特定的纯化需求。这些产品可以用来纯化包含聚组氨酸标签蛋白（组氨酸的数目可由四到十不等）。六个组氨酸组成的标签最为常用。在本手册描述的标准结合和洗脱条件下，与六个组氨酸组成的亲和标签相比，短一些的（四个组氨酸组成的）标签与柱材结合得更弱，长一些的（十个组氨酸组成的）标签结合得更强。在纯化过程中可以利用这种结合能力不同的特性。例如，由于一个长标签的蛋白的结合能力更强，就可以在样品上柱时使用更高的咪唑浓度，用来防止不想要的宿主细胞蛋白结合到柱材上去，同样也可以在洗脱前的洗涤过程中使用更高浓度的咪唑。这样可以去除可能与短标签蛋白一同纯化出来的杂蛋白。优化纯化组氨酸标签蛋白的信息请参照第4章。

General purification of histidine-tagged proteins

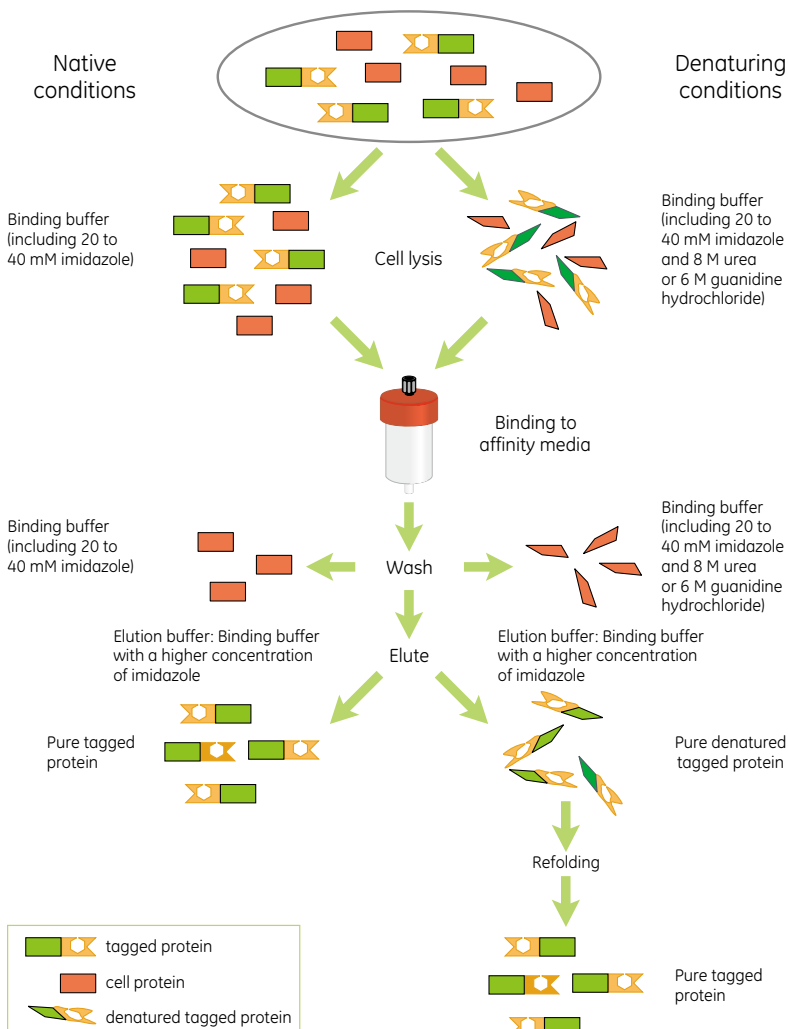


图9：采用装配了 Ni^{2+} 离子的亲和介质来纯化组氨酸标签蛋白的大体流程。装配了其它金属离子的介质可以采用同样的流程。

总体考虑

柱材的种类和形式

用于纯化组氨酸标签蛋白的柱材可以预先装载好Ni²⁺离子，也可以未装载。未装载的介质可以装载其它的金属离子以便调节选择性。GE Healthcare提供的装载好的介质包括Ni Sepharose High Performance 和 Ni Sepharose 6 Fast Flow，它们以预装柱或实验室自装的形式提供。未装载的介质包括IMAC Sepharose High Performance 和 IMAC Sepharose 6 Fast Flow，同样以预装柱或实验室自装的形式提供。

Ni Sepharose High Performance 和Ni Sepharose 6 Fast Flow由高度交联的琼脂糖珠和固定化螯合基团组成。正如产品名称所示，介质预装了Ni²⁺离子。介质与通常使用的水溶性缓冲液、还原剂、6M盐酸胍和8M尿素等变性剂以及一系列在蛋白纯化过程中通用的添加剂都兼容。柱材的性质列表请参照附录1。

不同大小和种类的预装柱和96孔形式的过滤板以及容易自装的Ni Sepharose High Performance 和 Ni Sepharose 6 Fast Flow介质与传统的批量蛋白纯化方法相比提供了更快速方便的选择。批量纯化有时也会使用，如标签不能暴露在外或者裂解物里的目的蛋白浓度很低（两种情况下都在纯化的第一步表现出低产率）。一个用以提高产率的更方便的选择是降低流速或者把样品多次流过柱子。

我们建议首先使用预装Ni Sepharose High Performance 和 Ni Sepharose 6 Fast Flow柱子。如果你认为提高选择性会有好处的话，下一步把金属离子装载到未装载的介质上。需要测试多种金属离子以确定分离最适合的那种。GE Healthcare为这一用途提供有多种未装载的IMAC纯化产品：方便的预装的1ml和5ml的HiTrap IMAC HP和HiTrap IMAC FF和20ml的HiPrep TM IMAC FF 16/10柱子，也有IMAC Sepharose High Performance 和 IMAC Sepharose 6 Fast Flow介质。柱材的性质列表请参照附录1。

通过一种或者多种方法监测纯化步骤将在本章稍后提到。应该根据纯化的需要来选择仪器（见第二章）。

金属离子

总的来说，Ni²⁺离子是纯化聚氨酸标签蛋白的首选金属离子。然而，需要注意的是有些情况下，尝试其它金属离子（比如Zn²⁺和Co²⁺）也是明智的选择，因为结合强度依赖于组氨酸标签重组蛋白同时也依赖于金属离子。这个话题在第4章也有讨论。



从Ni Sepharose High Performance 和 Ni Sepharose 6 Fast Flow上Ni²⁺的泄漏在正常条件下是比较低的，低于所检测的其它预装载介质（见GE Healthcare数据文件11-0008-86）。此外，从IMAC Sepharose High Performance 和 IMAC Sepharose 6 Fast Flow上的金属离子泄漏也比相同条件下所检测的其它IMAC介质要低。对于很苛刻的应用，纯化中的泄漏可以通过在上样前预先进行一次空白运行而进一步降低（见纯化过程）。



使用含有Ni的产品可能造成过敏反应

缓冲液

- 用于准备缓冲液的水和化学药品都应该是高纯的。使用前用0.22 μ m或0.45 μ m滤膜过滤。
- 我们建议使用组氨酸缓冲液试剂盒（需分别购买）以省掉费时的准备缓冲液过程，从而促进快速、可重复并且方便的纯化工作。该试剂盒包括浓的磷酸缓冲液、高纯度的2M咪唑储液，用来快速纯化组氨酸标签蛋白。
- 我们建议在中性或弱碱性pH值（pH 7到8）、有0.5M到1M 氯化钠存在的条件下进行结合。缓冲液和样品中含有盐能够消除离子交换效应，但对蛋白与柱材的结合影响不大。磷酸盐缓冲液经常使用。通常也可以使用Tris-HCl缓冲液，但是当金属离子和蛋白的亲合力弱的时候应该避免使用，因为它可能会降低结合强度。避免在缓冲液中使用螯合试剂比如EDTA或柠檬酸。咪唑经常用来洗脱组氨酸标签蛋白，因为它可以通过和金属离子结合而高效地替换掉组氨酸。应当使用低浓度的咪唑来洗掉结合更弱的宿主细胞蛋白，用以增加目的蛋白的纯度。应使用在280nm没有吸收的高纯度咪唑。

膜蛋白必须在纯化的样品及缓冲液中添加去垢剂。注意需要优化氯化钠的浓度以避免沉淀。包涵体中的蛋白应首先用8M尿素或6M盐酸胍溶解，溶解后的变性蛋白可以在变性剂存在的情况下纯化。如果进行柱上复性，应准备包含低浓度或零浓度变性剂的洗脱缓冲液。参照第8章关于包涵体蛋白的讨论。

- 含有尿素的蛋白可以直接用SDS-PAGE分析，但含有盐酸胍的蛋白必须用缓冲液交换的方法换至含尿素的缓冲液中才能进行SDS-PAGE分析，因为盐酸胍溶液具有很高的离子强度。

咪唑

咪唑与蛋白竞争结合Ni Sepharose和IMAC Sepharose。平衡缓冲液（结合和洗涤缓冲液）以及样品应该加入低浓度的咪唑来降低宿主细胞蛋白的非特异结合。初始的低浓度咪唑与固定的金属离子相结合，这对有控制的层析非常重要。在某个较高的浓度，咪唑也可以降低组氨酸蛋白标签的结合。因此，任何步骤的咪唑浓度必须经过优化以达到高纯度（宿主细胞的低结合）和高产率（组氨酸标签蛋白的强结合）的平衡。对每个蛋白来说，能给出理想的纯化效果的咪唑的浓度（在结合缓冲液和样品中的咪唑浓度）都是不一样的，这一浓度（推荐为20-40mM）对Ni Sepharose High Performance 和 Ni Sepharose 6 Fast Flow 来说要比市场上类似的介质偏高（相关讨论见GE Healthcare数据文件11-0008-86）。有关通过改变咪唑浓度优化组氨酸标签蛋白纯化的讨论见第4章。

 使用高纯度咪唑，它们在280nm通常会有非常低或没有吸收。

 如果需要从蛋白中除去咪唑，根据样品体积使用HiTrap Desalting, PD-10 Desalting 或 HiPrep 26/10 Desalting 脱盐柱。

其它洗脱溶液

作为对咪唑洗脱的额外选择，组氨酸标签蛋白可以用其它的方法或方法的组合进行洗脱：比如，在pH值2.5-7.5范围内降低pH。在pH4以下，金属离子会从柱材上剥离。

注意：当使用除Ni²⁺以外的其它金属离子时，经常不能使用低pH值洗脱。这是蛋白和金属离子依赖性的。

EGTA或EDTA是强螯合剂，也能用于洗脱。但它们也能够把金属离子从介质上剥离，因此导致蛋白的洗脱。共同洗脱的金属离子在蛋白溶液中仍然被螯合着，但是可以被脱盐柱很容易地除去。比如HiTrap Desalting, PD-10 Desalting or HiPrep 26/10 desalting 脱盐柱。

注意：下次纯化前柱子需要被再次用金属离子装载。

样品制备的大体步骤

对于培养、诱导、裂解组氨酸标签重组蛋白的最优条件，请参照已经建立好的步骤。下面是从细菌培养物中制备样品和细胞裂解物的大体步骤。其它建立好的步骤也可以使用。

这个步骤和本章所包括的大部分纯化方案都能很好地协同工作。然而，对该步骤的一些修正会在相关处提及。

1. 在40C用7000-8000×g将细胞培养物离心10min或者用1000-1500×g将细胞培养物离心30min，以收集细胞。
2. 弃去上清，将菌体沉淀置于冰上。
3. 每克菌体用5-10ml结合缓冲液稀释。

 为防止有组氨酸暴露在外的宿主细胞蛋白结合在介质上，在样品和结合缓冲液中，加入低浓度的咪唑是非常重要的（详见第4章）。

4a. 酶裂解：加入0.2mg/ml的溶菌酶，20ug/ml的DNase，1mM MgCl₂，1mM PefablocTM SC或PMSF（所示浓度为终浓度）。在室温或40C搅拌30min。温度的选择取决于目的蛋白对温度的敏感程度。

4b. 机械裂解：在冰上超声破碎细胞大约10min（几个短的发声时段），用French press（或其它匀浆器械）匀浆，或反复冻融至少5次。

 机械破碎时间可以相应延长以获得用于上样的较好的裂解物，并能避免高柱压的问题。这对于将未净化的粗样品直接上样时（使用HisTrap FF粗柱）尤为重要。不同的蛋白对于

细胞裂解的敏感程度不同，并需要避免使样品加热和发泡。把超声或匀浆后未净化的样品在使用前冻起来会增加沉淀和聚集。对样品额外的超声可以避免增加上样时的柱压。

5. 需要时测量并调节pH值。



不要使用强碱或强酸调节pH值，这样可能会增加沉淀的风险。



样品必须完全溶解。为避免堵住柱子，我们建议离心并用0.45 μ m或0.22 μ m的滤膜过滤以除去细胞碎片或其它块状物质。

注意：当使用HisTrap FF粗柱、His GraviTrap、His MultiTrap HP或His MultiTrap FF时不需要该步骤。



如果样品不是在20mM pH 7.4的磷酸缓冲液、0.5M的氯化钠中，应调节氯化钠浓度到0.5M，pH值到7-8。这可以通过加入浓的储液、用结合缓冲液稀释，或通过缓冲液交换来实现（根据样品体积，使用HiTrap Desalting, PD-10 Desalting 或HiPprep 26/10 Desalting 脱盐柱）。

重要：为尽可能减小宿主细胞蛋白的结合，样品应该和结合缓冲液具有相同浓度的咪唑。该咪唑的浓度是蛋白依赖的，应该通过实验来确定，我们建议起始浓度为20-40 mM 咪唑。



如果组氨酸标签重组蛋白以包涵体的形式表达，它们必须用6M盐酸胍或8M尿素溶解，并且所选用的变性剂必须在层析的所有缓冲液中存在。操作包涵体蛋白的建议可以在第8章及本章稍后的问题解决部分找到。

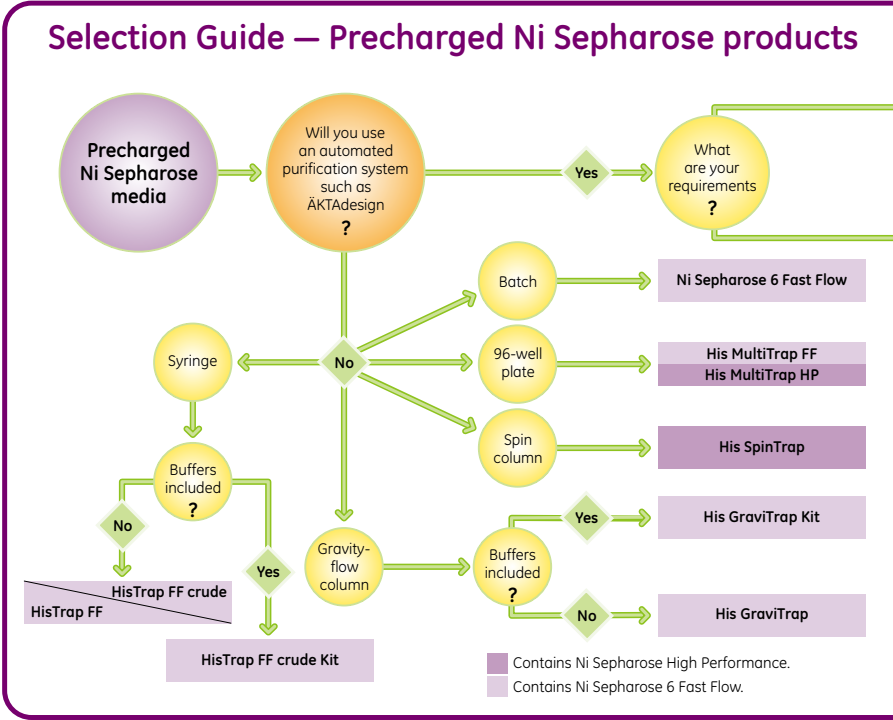


图10：预装载Ni柱材的选择指南。

图10 提供了预装Ni Sepharose产品的选择指南，表9具体描述了这些选项。总的来说，当高分辨和高载量重要时，建议使用Ni Sepharose High Performance；而当需要规模化放大时，建议使用Ni Sepharose 6 Fast Flow。类似有关未装载金属离子的柱材的信息在本章稍后会有所提及，从第72页开始。

表9：用预装载的柱材纯化组氨酸标签蛋白的选择。

产品	形式或柱子大小	大概的结 合能力	描述	高通量筛选	小量制备	批量/重力流	注射器	ÄKTA design 系统
Ni Sepharose High Performance	25ml 100ml	40mg/ml	用于高分辨、洗脱更浓的样品（高效纯化）	+	(+)	-	-	+

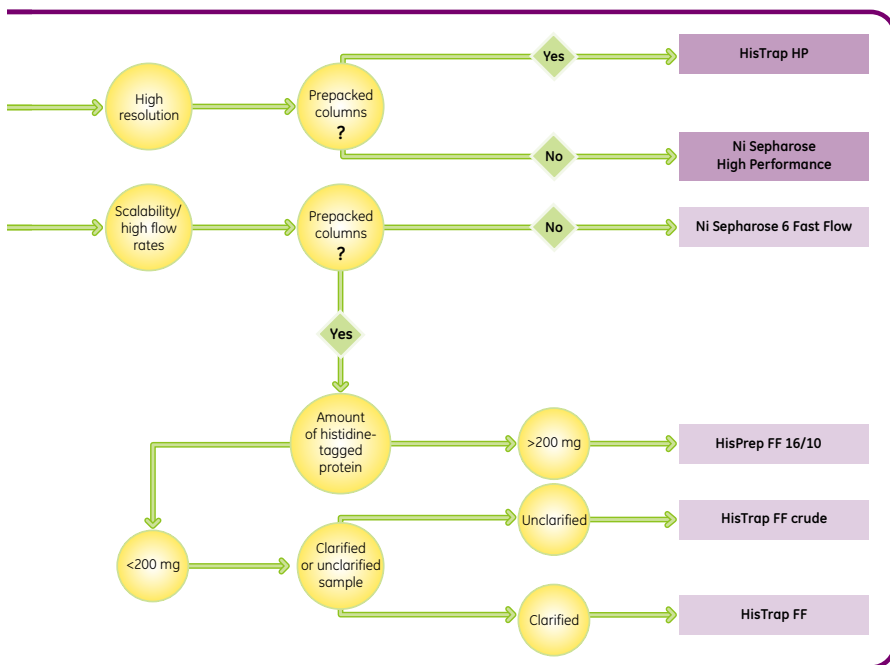


表9：用预装载的柱材纯化组氨酸标签蛋白的选择

产品	形式或柱子大小	大概的总结能力	描述	高通量筛选	小量制备	批量/重力流	注射器	ÄKTA design 系统
HisTrap HP	1ml 5ml	每根柱子 40mg 每根柱子 200mg	主要用于蠕动泵和层析系统。用于高分辨、洗脱更浓的样品（高效纯化）	-	-	-	(+)	+
His SpinTrap	100 µl	每根柱子 0.75mg	用于简单的小量制备组氨酸标签蛋白和快速表达筛选	-	+	-	-	-
His MultiTrap HP	9 6 孔过滤板板	每孔1mg	用于高通量筛选。可以用机器人或手动采用离心或真空方法。	+	-	-	-	-

产品	形 式 或 柱 子 大 小	大概的结 合能力	描述	高 通 量 筛 选	小 量 制 备	批 量/ 重 力 流	注 射 器	Ä K T A design 系统
Ni Sepharose 6 Fast Flow	5ml 25ml 100ml 500ml	40mg/ml	由于高载量和高流 速，非常适合规模 化放大	+	+	+	-	+
HisPrepTM FF 16/10	20ml	每根柱子 800mg	使用层析系统。 规模化纯化。	-	-	-	-	+
HisTrapFF	1ml	每根柱子 40mg	可以用注射器，蠕 动泵和层析系统。	-	-	-	+	+
	5ml	每根柱子 200mg	提供优良的流动性 能。 放大纯化。					
HisTrapFF crude	1ml	每根柱子 40mg	用于未离心的粗裂 解物。可以用注射	-	-	-	+	+
	5ml	每根柱子 200mg	器、蠕动泵或层析 系统。					
HisTrap FF crude试剂盒	3 × 1ml	每根柱子 40mg	试剂盒包括3根1毫 升HisTrap FF crude 柱子，所有需要的 连接头，一根注射 器和说明书	-	-	-	+	-
His GraviTrap 和His GraviTrap试 剂盒	1ml	每根柱子 40mg	用于重力流，可以 直接纯化净化后的 及未净化的细胞裂 解物。试剂盒包括 柱子和His Buffer试 剂盒	-	-	+	-	-
His MultiTrap FF	9 6 孔 过 滤板	每孔 0.8mg	用于高通量筛选。 可以用机器人或手 动采用离心或真空 方法。	+	-	-	-	-
附带产品								
His Buffer试 剂盒	1个试剂 盒	N/A	预制好了用于手动 纯化组氨酸标签蛋 白的缓冲液	-		+	+	-

包含Ni Sepharose 6 Fast Flow

包含Ni Sepharose High Performance

用Ni Sepharose High Performance纯化蛋白

Ni Sepharose High Performance由高度交联的6%琼脂糖珠组成（直径 $34\text{ }\mu\text{m}$ ），螯合基团固定在上面，随后装载了 Ni^{2+} 离子。装载了 Ni^{2+} 离子的螯合基团提供了对组氨酸标签蛋白非常强的结合能力，介质的 Ni^{2+} 离子渗漏可忽略不计。

Ni Sepharose High Performance介质与通常使用的水溶性缓冲液、还原剂、6M盐酸胍和8M尿素等变性剂以及一系列在蛋白纯化过程中通用的添加剂（见附录1）都兼容。它在广泛的pH范围内稳定。这种化学和物力性质的高稳定以及广泛的兼容性保持了纯化产品的生物学活性并增加了产量。同时，它极大地延展了适合操作的条件，包括清洗柱材的过程。

优良的流速和包含浓缩物质的不同分离峰使Ni Sepharose High Performance成为高效纯化所需的柱材。Ni Sepharose High Performance柱材的性质列表请参照附录1。

Ni Sepharose High Performance以在20%乙醇中预浸胀好的形式提供，包装的大小有25ml和100ml，也有方便的预装好的形式（在本章稍后提及）。



图11：预装载 Ni^{2+} 离子的Ni Sepharose High Performance用来高效纯化组氨酸标签蛋白。

装柱

装柱的大体指南请参见附录4。

理想情况下，Sepharose High Performance柱材通过两步填装在XK或Tricorn™柱子中：在第一步不要超过1.0bar（0.1MPa），在第二步不要超过3.5bar（0.35MPa）。如果填装仪器不包括压力指示器，在第一步用5ml/min的流速（XK16/20）或2ml/min的流速（Tricon 10/100柱子），在第二步用9ml/min（XK16/20）或3.6ml/min（Tricon 10/100柱子）的流速。如果不能达到推荐的压力或流速，使用泵所能及的最大流速，这也会提供一个填装完好的柱床。

1. 组装柱子（需要时一同组装装柱池）
2. 用蒸馏水冲洗以除去末端以及适配器中的气泡。确认在柱床支持处无气泡残留。关掉柱子流出口，保持柱床支持处被水覆盖。
3. 重悬介质，单次连续地把柱材悬浊液铺在柱管中。用靠在柱管上的玻璃棒引流会尽量减少气泡的引入。
4. 如果使用装柱池，迅速将柱子其它空白处和装柱池充满水，将适配器或装柱池的盖子装上，然后将柱子连接到泵上，避免在适配器或入水管中残存气泡。
5. 打开柱子底部出口，将泵设置为所需流速。
6. 保持装柱流速至少3个柱体积，直到达到一个稳定不变的柱床高度。在柱上标记柱床高度。
7. 关闭泵，关上柱子出口。
8. 如果使用装柱池，解开装柱池，并把适配器装到柱子上。
9. 解开适配器入口，将适配器推进柱子，直到达到标记处。用装柱溶液冲洗适配器入口，锁定适配器位置。
10. 将柱子连接到泵或者层析系统上，并开始平衡。如果需要，重新调整适配器。

注：在随后的层析过程中，流速不要超过装柱流速的75%。

样品制备

通用的样品制备过程请参照第26页。

 通过加入缓冲液、氯化钠、咪唑和添加剂的浓储液，用结合缓冲液稀释样品，或者通过交换缓冲液等手段来使样品适合结合缓冲液的组成和pH值。在样品和结合缓冲液中添加低浓度的咪唑对于防止有组氨酸暴露在外的宿主细胞蛋白结合在柱上是必要的（见第4章）。

 在使用样品前一刻，将样品用0.22或0.45 μ m的滤膜过滤并且（或者）离心。如果样品过于粘稠，为了防止堵塞柱子，需用结合缓冲液稀释样品、增加裂解操作（离心、匀浆）或加入DNase/RNase来降低核酸片断的大小。

准备缓冲液

结合缓冲液：20mM 磷酸钠，0.5M 氯化钠，20-40mM 咪唑，pH7.4（最优的咪唑浓度是蛋白依赖的，20-40mM 适合于大多数蛋白）

洗脱缓冲液：20mM 磷酸钠，0.5M 氯化钠，500mM 咪唑，pH7.4

- 用于准备缓冲液的水和化学药品应该是高纯的。使用前用0.45μm的滤膜过滤。用高纯度的咪唑，这会在280nm处无紫外吸收或低吸收。
- 对于不同的蛋白，需要在样品和缓冲液中添加的咪唑（以获得最好的纯度和产量）浓度也会不同。在结合缓冲液中，20-40mM咪唑适合于大多数蛋白。洗脱缓冲液中的500mM咪唑能够保证目的蛋白的完全洗脱。
- 作为用咪唑洗脱的替换选择，可以降低pH值至4.5（金属离子在pH低于4.0时会从介质上被剥离下来）。

纯化

1. 如果柱子中含有20%的乙醇，用蒸馏水洗5个柱体积，线性流速为50-100cm/h。流速的计算请参见附录6。
2. 以150cm/h的线性流速用5到10个柱体积的结合缓冲液平衡柱子。
3. 加入预处理过的样品。
4. 用结合缓冲液洗涤，直到吸收达到基线。
5. 用洗脱缓冲液洗脱，可以采用逐步洗脱或线性梯度洗脱。如果采用逐步洗脱，5个柱体积通常就足够了。如果采用线性梯度洗脱，一个20个柱体积的缓梯度可能会分离有近似结合能力的蛋白。
6. 洗脱后，用5-10个柱体积的结合缓冲液再生柱子。此时柱子可用于下一次纯化。

- 如果纯化同一蛋白，柱子不需要进行金属离子的剥离和重新装载的过程。重复使用任何柱子都取决于样品的性质，同一柱子应该用来纯化相同的蛋白，以避免交叉污染。关于本话题以及柱子清洗和储存的更多信息请参见附录1。

- 如果手动测量吸收，请用洗脱缓冲液作为参比。如需要把咪唑从蛋白中除去，请使用HiTrap Desalting, PD-10 Desalting 或 HiPrep 26/10 Desalting 脱盐柱。

- Ni Sepharose与还原剂兼容。然而，我们建议在加入含有还原剂的缓冲液/样品之前，除去任何弱结合的Ni²⁺离子。这可以通过用没有还原剂的一个空白运行来实现（见下文）。不要把Ni Sepharose High Performance用含有还原剂的缓冲液保存。

- 在所有正常的情况下，从Ni Sepharose 上泄漏的Ni²⁺离子很少。该介质的泄漏比其他检测的预装载的IMAC介质都要低。
对于非常苛刻的应用，纯化过程中Ni的泄漏可以通过在上样前进行空白运行（见下文）而进一步降低。

空白运行

使用不含还原剂的结合缓冲液和洗脱缓冲液。

1. 用5个柱体积的蒸馏水洗涤柱子以除去20%乙醇。
2. 用5个柱体积的洗脱缓冲液洗涤。
3. 用10个柱体积的结合缓冲液平衡柱子。

用Ni Sepharose 6 Fast Flow进行纯化

Ni Sepharose 6 Fast Flow由90 μ m高度交联的琼脂糖珠组成。螯合基团固定在上面，随后装载了Ni²⁺离子。装载了Ni²⁺离子的螯合基团提供了非常强的结合能力，介质的Ni²⁺离子渗漏可忽略不计。Ni Sepharose 6 Fast Flow介质高流速的性质使它适合规模化放大纯化同时也适合采用重力流纯化。此外，介质和在组氨酸标签重组蛋白纯化中使用的绝大多数添加剂都兼容。（Ni Sepharose 6 Fast Flow的主要性质参见附录1）。



图12：Ni Sepharose 6 Fast Flow被用来大量纯化组氨酸标签重组蛋白，同时也可用于重力流纯化。

如果采用一次性的PD-10柱子，Ni Sepharose 6 Fast Flow适用于批量/重力流纯化组氨酸标签蛋白。预装在PD-10柱子中的Ni Sepharose 6 Fast Flow表现了优异的性能，具体体现在快速的纯化时间和在重力流纯化中的总蛋白收率。见第66页的 His GraviTrap和数据文件 11-0008-86。

Ni Sepharose 6 Fast Flow以在20%乙醇中预浸胀好的形式提供，包装的大小有5,25,100和250ml，也以方便的预装柱形式提供（本章稍后讨论）。

装柱

装柱的大体指南请参见附录4。

理想情况下，Sepharose High Performance柱材通过两步填装在XK或Tricon柱子中：在第一步不要超过0.5bar（0.05MPa），在第二步不要超1.5bar（0.15MPa）。如果填装仪器不包括压力指示器，在第一步用2.5ml/min的流速（XK16/20）或0.9ml/min的流速（Tricon 10/100柱子），在第二步用8.7ml/min（XK16/20）或4.7ml/min（Tricon 10/100柱子）的流速。

1. 组装柱子（需要时一同组装装柱池）。
2. 用蒸馏水冲洗以除去末端以及适配器的气泡。确认在柱床支持处无气泡残留。关闭柱子流出口，保持柱床支持处被水覆盖。
3. 重悬介质，单次连续地把柱材悬浊液铺在柱管中。用靠在柱管上的玻璃棒引流会尽量减少气泡的引入。
4. 如果使用装柱池，迅速将柱子其它空白处和装柱池充满水，把适配器或装柱池的盖子装上，然后将柱子连接到泵上，避免在适配器或入水管中残存气泡。
5. 打开柱子底部出口，将泵设置为所需流速。
6. 保持装柱流速至少3个柱体积，直到达到一个稳定不变的柱床高度。在柱上标记柱床高度。
7. 关闭泵，关闭柱子出口。
8. 如果使用装柱池，解开装柱池，并把适配器装到柱子上。
9. 解开适配器入口，将适配器推进柱子，直到达到标记处。用装柱溶液冲洗适配器入口，锁定适配器位置。
10. 将柱子连接到泵或者层析系统上，并开始平衡。如果需要，重新调整适配器。

注：在随后的层析过程中，流速不要超过装柱流速的75%。

样品制备

通用的样品制备过程请参照26页。

通过加入缓冲液、氯化钠、咪唑和添加剂的浓储液，用结合缓冲液稀释样品，或者通过交换缓冲液等手段来使样品适合结合缓冲液的组成和pH值。在样品和结合缓冲液中添加低浓度的咪唑对于防止有组氨酸暴露在外的宿主细胞蛋白结合在柱上是必要的（见第4章）。

在使用样品前一刻，将样品用0.22或0.45 μ m的滤膜过滤并且（或者）离心。如果样品过于粘稠，为了防止堵塞柱子，需用结合缓冲液稀释样品、增加裂解操作（离心、匀浆）或加入DNase/RNase来降低核酸片断的大小。

准备缓冲液

结合缓冲液：20mM 磷酸钠，0.5M 氯化钠，20-40mM 咪唑，pH7.4（最优的咪唑浓度是蛋白依赖的，20-40mM 适合于大多数蛋白）

洗脱缓冲液：20mM 磷酸钠，0.5M 氯化钠，500mM 咪唑 pH7.4

用于准备缓冲液的水和化学药品应该是高纯的。使用前用0.45 μ m的滤膜过滤。用高纯度的咪唑，这会在280nm处无紫外吸收或低吸收。

 对于不同的蛋白，需要在样品和缓冲液中添加的咪唑（以获得最好的纯度和产量）浓度也会不同。在结合缓冲液中，20-40mM咪唑适合于大多数蛋白。洗脱缓冲液中的500mM咪唑能够保证目的蛋白的完全洗脱。

 作为用咪唑洗脱的替换选择，可以降低pH值至4.5（金属离子在pH低于4.0时会从介质中被剥离下来）。

用装好的柱子进行纯化

1. 如果柱子中含有20%的乙醇，用蒸馏水洗5个柱体积，线性流速为50-100cm/h。流速的计算请参见附录6。
2. 以150 cm/h的线性流速用5到10个柱体积的结合缓冲液平衡柱子。
3. 加入预处理过的样品。
4. 用结合缓冲液洗涤，直到吸收达到基线。
5. 用洗脱缓冲液洗脱，可以采用逐步洗脱或线性梯度洗脱。如果采用逐步洗脱，5个柱体积通常就足够了。如果采用线性梯度洗脱，一个20个柱体积的缓梯度可能会分离有近似结合能力的蛋白。
6. 洗脱后，用5-10个柱体积的结合缓冲液再生柱子。此时柱子可用于下一次纯化。

 如果纯化同一蛋白，柱子不需要进行金属离子的剥离和重新装载的过程。重复使用任何的柱子都取决于样品的性质，同一柱子应该用来纯化相同的蛋白，以避免交叉污染。关于本话题以及柱子清洗和储存的更多信息请参见附录1。

 如果手动测量吸收，请用洗脱缓冲液作为参比。如需要把咪唑从蛋白中除去，请使用 Hitrap Desalting, PD-10 Desalting 或 HiPrep 26/10 Desalting 脱盐柱。

 Ni Sepharose与还原剂兼容。然而，我们建议在加入含有还原剂的缓冲液/样品之前，除去任何弱结合的Ni²⁺离子。这可以通过用没有还原剂的一个空白运行来实现（见下文）。不要把Ni Sepharose High Performance用含有还原剂的缓冲液保存。

 在所有正常的情况下，从Ni Sepharose上泄漏的Ni²⁺离子很少。该介质的泄漏比其他检测的预装载的IMAC介质都要低。

对于非常苛刻的应用，纯化过程中Ni的泄漏可以通过在上样前进行空白运行（见下文）而进一步降低。

空白运行

使用不含还原剂的结合缓冲液和洗脱缓冲液。

1. 用5个柱体积的蒸馏水洗涤柱子以除去20%乙醇。
2. 用5个柱体积的洗脱缓冲液洗涤。
3. 用10个柱体积的结合缓冲液平衡柱子。

用批量/重力流的方法纯化

样品制备：

通用的样品制备过程请参照26页。

通过加入缓冲液、氯化钠、咪唑和添加剂的浓储液，用结合缓冲液稀释样品，或者通过交换缓冲液等手段来使样品适合结合缓冲液的组成和pH值。在样品和结合缓冲液中添加低浓度的咪唑对于防止有组氨酸暴露在外的宿主细胞蛋白结合在柱上是必要的（见第4章）。

在使用样品前一刻，将样品用0.22或0.45μm的滤膜过滤并且（或者）离心。如果样品过于粘稠，为了防止堵塞柱子，需用结合缓冲液稀释样品、增加裂解操作（离心、匀浆）或加入DNase/RNase来降低核酸片断的大小。

准备缓冲液

结合缓冲液：20mM 磷酸钠，0.5M 氯化钠，20-40mM 咪唑，pH7.4（最优的咪唑浓度是蛋白依赖的，20-40mM 适合于大多数蛋白）

洗脱缓冲液：20mM 磷酸钠，0.5M 氯化钠，500mM 咪唑，pH7.4

用于准备缓冲液的水和化学药品应该是高纯的。用高纯度的咪唑，这会在280nm处无紫外吸收或低吸收。

对于不同的蛋白，需要在样品和缓冲液中添加的咪唑（以获得最好的纯度和产量）浓度也会不同。在结合缓冲液中，20-40mM咪唑适合于大多数蛋白。洗脱缓冲液中的500mM咪唑能够保证目的蛋白的完全洗脱。

作为用咪唑洗脱的替换选择，可以降低pH值至4.5（金属离子在pH低于4.0时会从介质中被剥离下来）。

准备一次性PD-10空柱子

1. 用20%的乙醇洗涤滤膜。
2. 用蒸馏水润洗滤膜。
3. 将滤膜插入一次性PD-10空柱子（其它种类的重力流柱也可使用）。

介质准备

1. 轻柔地振荡瓶子，直到悬浊液均一。
2. 将足够量的悬浊液从瓶中转移到离心管中。
3. 用500×g离心5分钟以沉淀Ni Sepharose 6 Fast Flow柱材。
4. 除去上清，用5ml蒸馏水替换。
5. 轻柔地振荡悬浊液3分钟，再次用500×g离心5分钟。
6. 用结合缓冲液替代蒸馏水，重复步骤4和5。
7. 把悬浊液转移到量筒中。
8. 加入合适体积的结合缓冲液，使悬浊液中柱材的浓度达到50%。

用重力流纯化

1. 将样品加入含有50%柱材的悬浊液中。Ni Sepharose 6 Fast Flow的结合能力是蛋白依赖的，平均来说是40mg/ml。这意味着1ml含有50%柱材的悬浊液能够大概结合20mg组氨酸标签蛋白。
2. 将样品和Ni Sepharose 6 Fast Flow柱材在摇床上低速混合1小时。
3. 将样品和Ni Sepharose 6 Fast Flow的混合物加入到PD-10柱子中，收集流出物。
4. 用结合缓冲液洗涤2到5个柱体积，收集流出物。比如，如果使用0.5ml Ni Sepharose 6 Fast Flow 柱材（1毫升含有50%柱材的悬浊液）则需要用1-2.5ml的结合缓冲液洗涤。
5. 用4倍柱体积的洗脱缓冲液洗脱，用4个不同的管收集洗脱组分。
6. 用分光光度计测量280nm的紫外吸收，用SDS-PAGE确定样品纯度。使用洗脱缓冲液作为对照。

 Ni Sepharose与还原剂兼容。然而，我们建议在加入含有还原剂的缓冲液/样品之前，除去任何弱结合的Ni²⁺离子。这可以通过用没有还原剂的一个空白运行来实现（见下文）。不要把Ni Sepharose 6 Fast Flow用含有还原剂的缓冲液保存。

 在所有正常的情况下，从Ni Sepharose 上泄漏的Ni²⁺离子很少。该介质的泄漏比其他检测的预装载的IMAC介质都要低。

对于非常苛刻的应用，纯化过程中Ni的泄漏可以通过在上样前进行空白运行（见下文）而进一步降低。

空白运行

使用不含还原剂的结合缓冲液和洗脱缓冲液。

1. 用5个柱体积的蒸馏水洗涤柱子以除去20%乙醇。
2. 用5个柱体积的洗脱缓冲液洗涤。
3. 用10个柱体积的结合缓冲液平衡柱子。

 这可以通过将重悬的介质进行离心洗涤或者更有效地通过玻璃砂芯漏斗（柱材级别G3型）过滤洗涤。

使用His MultiTrap HP和 His MultiTrap FF 96孔过滤板进行高通量筛选

His MultiTrap HP和 His MultiTrap FF是预装的、一次性使用的96孔过滤板，用来进行可重复的高通量筛选组氨酸标签重组蛋白。典型的应用是表达筛选不同的表达克隆，筛选可溶蛋白，优化小量平行纯化的条件。这些过滤板分别预装了Ni Sepharose High Performance和Ni Sepharose 6 Fast Flow柱材。

预装的His MultiTrap HP和 His MultiTrap FF每个孔中含有500 μ l 10%Ni Sepharose High Performance和Ni Sepharose 6 Fast Flow柱材的悬浊液。这些柱材保存在储存溶液中（50 μ l的柱材保存在20%的乙醇中），它们分别具有能够纯化最多1mg和0.8mg组氨酸标签蛋白的载量。过滤板由聚丙烯和聚乙烯制成。

His MultiTrap HP和 His MultiTrap FF介质的性质在附录1中列出。装载了Ni²⁺离子的介质和所用通常使用的水溶液、还原剂、变性剂（如6M盐酸胍和8M尿素）、一系列其它的添加剂都兼容。

预装的His MultiTrap HP和 His MultiTrap FF板在洗脱所得蛋白的产量和纯度上能够保证孔和孔之间以及板和板之间的可重复性。可以使用自动化的机器人系统操作，也可以手动采用离心和真空压力的方法操作。纯化过程可以简单地规模化放大，因为Ni Sepharose介质以更大的预装柱形式或实验室自装的形式提供。从MultiTrap板到HisTrap 1ml或5ml柱子的放大纯化而保持纯化条件不变（比如Fast Flow 或 High Performance柱材、咪唑浓度等）能够提供高度一致的结果，并且减少规模化过程所需的优化时间。



图13: His MultiTrap HP和 His MultiTrap FF预装在96孔过滤板中，用来进行对组氨酸标签重组蛋白的高通量表达筛选。

样品制备:

通用的样品制备过程请参照26页。

- 用商品化的试剂盒裂解会产生较大的细胞碎片颗粒，在纯化过程中可能会干扰孔的排干。这一问题可以通过在上样前离心或者过滤样品来解决。
- 如果细胞破碎完全，可以把未净化的裂解物直接上样到孔中，而不用预离心或过滤样品。应将未净化的裂解物在制备后马上加入孔中，因为裂解物如果不立即使用或者在使用前冷冻的话会沉淀。对样品的再次裂解会防止在上样时堵塞孔。



如果样品过于粘稠，需要额外的延长用机械力处理样品的时间以确认样品达到完全裂解（把样品置于冰上避免过热）。

准备缓冲液

结合缓冲液：20mM 磷酸钠，0.5M 氯化钠，20-40mM 咪唑，pH7.4（最优的咪唑浓度是蛋白依赖的，20-40mM 适合于大多数蛋白）

洗脱缓冲液：20mM 磷酸钠，0.5M 氯化钠，500mM 咪唑，pH7.4



为了增加纯度，可以在不降低结合能力的前提下，在样品和结合缓冲液中使用尽可能高浓度的咪唑。关于此话题的额外信息请参见第4章。

高通量筛选的离心方法

准备过滤板

1. 剥掉96孔过滤板底部的封膜。把过滤板放在一个容器中，用来容纳剥掉封膜时漏出的保存溶液。
2. 将过滤板顶颠倒轻柔振动，以使附着在顶部封膜上的介质脱离。把过滤板放回顶部朝上的位置。
3. 将过滤板靠着操作台表面放置，剥掉过滤板顶部的封膜。
4. 将过滤板放在收集板的上面。
5. 注：在以下的步骤中，根据需要更换或者清空收集板。
6. 将过滤板以 $500 \times g$ 离心2分钟，除去介质中的乙醇储存溶液。
7. 每孔加入 $500 \mu\text{l}$ 去离子水， $500 \times g$ 离心2分钟。
8. 每孔加入 $500 \mu\text{l}$ 结合缓冲液， $500 \times g$ 离心2分钟。重复一次。过滤板即可使用。



空白运行：在样品或缓冲液中可能含有还原剂。如果这样，在第7步前每孔需要加入 $500 \mu\text{l}$ 的洗脱缓冲液。在空白运行过程中，不要加入还原剂。上样前用含有还原剂的结合缓冲液再次平衡。不使用时，不要将His MultiTrap板子保存在含有还原剂的溶液中。

离心过程



在离心过程中不要用超过 $700 \times g$ 的转速。

1. 将未净化或已净化的裂解物（每孔最多 $600 \mu\text{l}$ ）上样到过滤板的孔中，温浴3分钟。
注：如果蛋白产量过低，增加温浴时间或温柔振动过滤板以充分混合。
2. 将过滤板用 $100 \times g$ 离心4分钟，或直到所有的孔都排空，弃去流出液。
3. 每孔加入 $500 \mu\text{l}$ 结合缓冲液用以洗去未结合的样品。 $500 \times g$ 离心2分钟。重复一次，或直到所有未结合的样品都被除去。
4. 每孔加入 $200 \mu\text{l}$ 的洗脱缓冲液，混合1分钟。

注：洗脱缓冲液的体积可以变化（每孔50到100 μ l），这取决于所需目的蛋白的浓度。

5. 更换收集板，500 $\times$ g离心2分钟收集洗脱的蛋白。重复两次或直到没有目的蛋白被洗脱下来。

注：高纯度的蛋白在280纳米的紫外吸收应该小于0.1。必要时可在每次洗脱之间更换收集板以防止目的蛋白被稀释。

用真空抽滤方法进行高通量筛选



如果使用真空抽滤方法时，一直存在发泡或在收集板中有气泡，就应该考虑采用离心方法。过滤板和收集板之间的距离非常关键，必要时应调整该距离。

准备过滤板

1. 剥掉96孔过滤板底部的封膜。把过滤板放在一个容器中，用来容纳剥掉封膜时漏出的保存溶液。
2. 把过滤板顶部朝下，轻柔振动，以使附着在顶部封膜上的介质脱离。把过滤板放回顶部朝上的位置。
3. 将过滤板靠着操作台表面放置，剥掉过滤板顶部的封膜。
4. 将过滤板放在收集板的上面。

注：在以下的步骤中，根据需要更换或者清空收集板。

5. 将真空度设为-0.15bar。把96孔板和收集板放在真空套管上，用以从柱材中除去乙醇储存溶液。
6. 每孔加入500 μ l去离子水。加真空，从孔中排干水。
7. 每孔加入500 μ l结合缓冲液，用来平衡柱材。同步骤5一样除去溶液，重复一次。过滤板即可使用。



空白运行：样品或缓冲液中可能含有还原剂。如果这样的话，在第7步前每孔需要加入500 μ l的洗脱缓冲液。在空白运行过程中，不要加入还原剂。上样前用含有还原剂的结合缓冲液再次平衡。不使用时，不要把His MultiTrap过滤板保存在含有还原剂的溶液中。

真空过程



在真空操作时，不要使压力超过-0.5bar。



如果使用机器人系统，真空必须根据系统来调整。

1. 将未净化或已净化的裂解物（每孔最多600 μ l）上样到过滤板的孔中，温浴3分钟。

注：如果蛋白产量过低，增加温浴时间或温柔振动过滤板，以充分混合。

2. 通过施加-0.15bar的真空度除去流出物，直到所有的孔都排空为止。缓慢的增加真空度到-0.30bar，大概5秒钟后关掉真空泵，弃去流出物。



过快的增加真空度会造成在过滤板底部起泡，进而造成样品的交叉污染。

- 每孔加入500 μ l结合缓冲液用以洗涤掉未结合的样品。同步骤2一样施加-0.15bar的真空度，重复一次或直到所有未结合的样品都被洗掉。
- 每孔加入200 μ l的洗脱缓冲液，混合1分钟。

注：洗脱缓冲液的体积可以变化（每孔50到100 μ l），这取决于所需目的蛋白的浓度。

- 更换收集板，施加-0.15bar的真空度收集被洗脱蛋白。重复两次或者直到没有目的蛋白被洗脱为止。

注：高纯度的蛋白在280纳米的紫外吸收应该小于0.1。必要时可在每次洗脱之间更换收集板以防止目的蛋白被稀释。

应用案例

在纯化膜蛋白时，用His MultiTrap FF确定缓冲液中去垢剂的溶解效应

96孔板形式的His MultiTrap HP和 His MultiTrap FF 允许高通量筛选和纯化组氨酸标签蛋白。本例中His MultiTrap FF被用来筛选8种去垢剂对于6种组氨酸标签重组膜蛋白的溶解效应。纯化筛选的GlpG蛋白（EM29）和阳离子转运蛋白（EM43）这两种蛋白的结果用斑点杂交和SDS-PAGE展示出来（图14）。这些结果显示，如果使用Mutitrap 96孔过滤板，用于筛选最合适于纯化膜蛋白的去垢剂的纯化条件很容易被优化，并且重复性很好。

96-well filter plate: His MultiTrap FF
 Sample: Six *E. coli* lysates containing histidine-tagged membrane proteins; probable transporter, ion transporter, putative transferase, regulatory protein, GlpG protein, and cation transporter; GlpG protein (EM29) and cation transporter (EM43) are shown here
 Sample preparation: Chemical and freeze/thaw lysis
 Sample volume: 100 μ l/well
 Elution method: Centrifugation
 Elution volume: 3 $\times$ 50 μ l/well
 Lysis buffer: 20 mM sodium phosphate, pH 7.4, 100 mM sodium chloride, 20 mM imidazole, 0.5 mM TCEP, 5 U/ml Benzonase™ Nuclease, 1 mg/ml lysozyme, EDTA-free protease inhibitor cocktail, 1% to 2% detergent, and 1X BugBuster™ Protein Extraction Reagent, 25 U/ml Benzonase Nuclease, 1 kU/ml rLysozyme™ Solution, and 2X Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablet solution
 Binding buffer: 20 mM sodium phosphate, pH 7.4, 500 mM sodium chloride, 20 mM imidazole, 0.5 mM TCEP, 1–2% detergent
 Wash buffer: 20 mM sodium phosphate, pH 7.4, 500 mM sodium chloride, 40 mM imidazole, 0.5 mM TCEP, 0.03% DDM, 1–2% detergent
 Elution buffer: 20 mM sodium phosphate pH 7.4, 500 mM sodium chloride, 500 mM imidazole, 0.5 mM TCEP, 0.03% DDM, 1–2% detergent
 Detergents: 1% Fos-Choline 12 (FC12), 1% undecyl maltoside (UDM), 1% dodecyl maltoside (DDM), 1% Cymal-5, 1% Cymal-6, 2% octyl glucoside (OG), 1% Triton™ X-100 (TX-100), 1% lauryl dimethylamine oxide (LDAO)
 Data evaluation: Dot-blot analysis on nitrocellulose membrane. Histidine-tagged proteins were detected using HisProbe™-HRP chemistry. SDS-PAGE with Coomassie staining

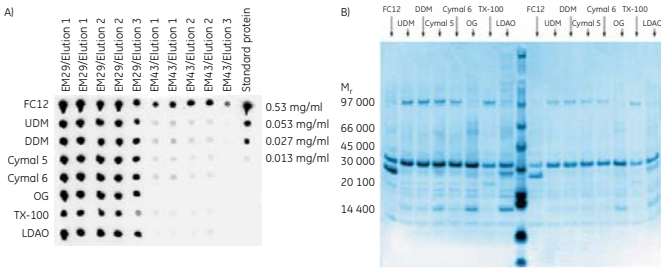


图14：A，用His MultiTrap FF在不同去垢剂存在的条件下纯化膜蛋白EM29和EM43的斑点杂交结果。重复的洗脱1，2是两个独立的破碎和纯化的结果。B，EM29在8种去垢存在的条件下用His MultiTrap FF纯化的SDS-PAGE（考马斯亮蓝染色）结果（杂交图中的洗脱1和2）。

用His SpinTrap小量制备

His SpinTrap被设计用于从未净化或已净化的细胞裂解物中进行高效的小量制备组氨酸标签重组蛋白。该柱也可用来在大量的小样裂解物中进行筛选并优化纯化条件。柱子预装了Ni Sepharose High Performance。His SpinTrap的主要特征参见附录1。

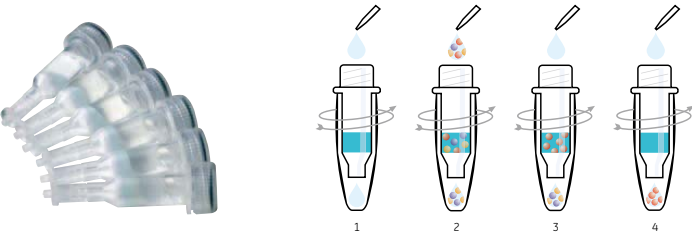


图15: His SpinTrap是一种一次性使用柱子，用来进行简单的小样纯化以及快速表达筛选组氨酸标签重组蛋白。用His SpinTrap纯化组氨酸标签重组蛋白是一种简单的，4步的过程，可用小型离心机在10分钟内完成：1. 把柱子放于2ml离心管中。通过加入结合缓冲液和离心来平衡。2.加样。3.用结合缓冲液洗涤。4.用洗脱缓冲液洗脱目的蛋白。

His SpinTrap需和标准的小离心机一同使用。一次纯化大概需要10分钟。His SpinTrap需使用His Buffer Kit配出的溶液以达到最佳性能。用His SpinTrap柱纯化未净化的样品可以使目的蛋白由于样品预离心、转移到离心管、收集上清等过程中的手动操作所造成的损失最小化。此外，把未净化的样品直接上样到His SpinTrap柱可以减少样品准备时间，能够使敏感目的蛋白的降解最小化。纯化过程见图15和图16。

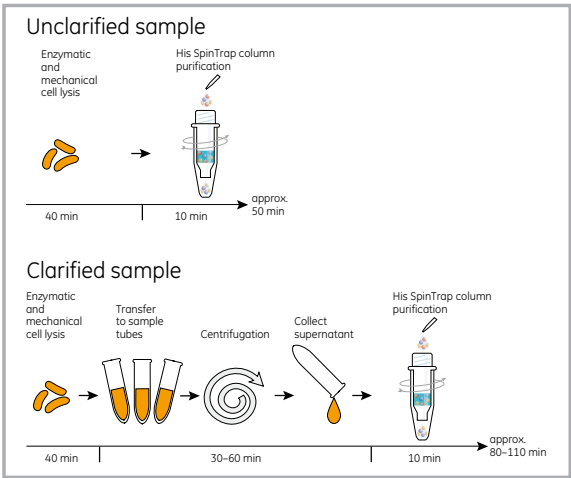


图16: 直接纯化未净化的样品所需总时间比已净化样品要少30到60分钟，因为节省了离心细胞裂解物所需的额外时间。

样品制备

通用的样品制备过程请参照26页。

下述的方法在我们自己的实验室被成功地用来制备用于His SpinTrap的样品。其它建立好的方法可能也会奏效。请使用标准的2毫升离心管。

1. 稀释细胞团：向20到50毫升（依赖于表达量）细胞培养液所获得的细胞团中加入1毫升结合缓冲液。

 为防止宿主细胞结合到暴露的组氨酸上，样品和结合缓冲液中需含有同样浓度的咪唑。

- 2a. 酶消化裂解：加入0.2mg/ml的溶菌酶，20 μ g/ml的DNase，1mM MgCl₂，1mM Pefablab SC或PMSF。温柔地用漩涡振荡器混匀，并在室温温浴30分钟。

 也可以使用化学裂解试剂盒，但首先确认它们不含有任何螯合剂。

- 2b. 机械裂解：反复冻融、匀浆、超声来破碎细胞。

 也可以将净化好的样品上样，只需在小离心机上用最大转速离心10分钟除去不溶物。收集上清并用His SpinTrap纯化。

准备缓冲液

 在天然环境下纯化蛋白的缓冲液可以方便地使用His Buffer Kit制备。

天然条件：

结合缓冲液：20mM 磷酸钠，500mM 氯化钠，20mM 咪唑，pH7.4

洗脱缓冲液：20mM 磷酸钠，500mM 氯化钠，500mM 咪唑，pH7.4

变性条件：

结合缓冲液：20mM Tris-HCl，8M尿素，500mM 氯化钠，5mM 咪唑，pH8.0，1-5mM beta-巯基乙醇

洗脱缓冲液：20mM Tris-HCl，8M尿素，500mM 氯化钠，500mM 咪唑，pH8.0，1-5mM beta-巯基乙醇

 在样品和结合缓冲液中需加入咪唑的最优浓度（用来获得最好的纯度和产量）每个蛋白都不同。在天然条件下，结合缓冲液中添加20-40mM的咪唑对大多数蛋白来说都是适合的。洗脱缓冲液中的500mM咪唑通常足够洗脱目的蛋白。

 作为用咪唑洗脱的替代方法，可把pH值降低到4.5。（注意，金属离子在pH低于4时会从介质上被剥离下来）

纯化

His SpinTrap采用标准的小离心机进行纯化。把柱子放在2毫升的离心管中用以收集离心过程流出的液体。每步用一个新的离心管（步骤1到6）。

1. 反复颠倒并振动柱子以重悬介质。将上盖旋转四分之一圈以使其变松，打开底部盖子。
2. 将柱子放在2毫升的离心管中，用70-100×g（如果使用EppendorfTM 5415R，24孔固定角转头大概1000rpm）的速度离心30秒以除去储存柱子用的液体。
3. 移除上盖，用600 μl 结合缓冲液平衡柱子，用70-100×g的速度离心30秒。
4. 4加入至多600 μl 制备好的样品，用70-100×g的速度离心30秒。

 只要不超过柱子的结合能力（见附录1），可以多次上样。

5. 用600 μl 的结合缓冲液洗涤，用70-100×g的速度离心30秒。
6. 用200 μl 洗脱缓冲液洗脱目的蛋白两次，用70-100×g的速度离心30秒，收集纯化的样品。第一个200 μl 洗脱物中含有大部分的目的蛋白。

应用案例

用 His SpinTrap纯化未净化的样品

用His SpinTrap柱从未净化的大肠杆菌裂解物中纯化组氨酸标签重组蛋白的性能评估如下：组氨酸标签的绿色荧光蛋白，GFP-(His)6在BL21大肠杆菌裂解物中首先用酶消化裂解然后超声破碎10分钟，未净化的裂解物直接上样到His SpinTrap柱上。为做比较，一半样品在纯化前通过离心净化。样品和结合缓冲液含有60mM咪唑。为使与Ni Sepharose High Performance有很强亲和力的GFP-(His)6蛋白完全洗脱，洗脱缓冲液中含有800mM 咪唑，而不是通常的500mM。纯化未净化 and 已净化的样品的时间耗费10分钟。最后从净化样品及未净化样品纯化所得的洗脱蛋白的纯度由SDS-PAGE判断，结果基本相同（图17）。

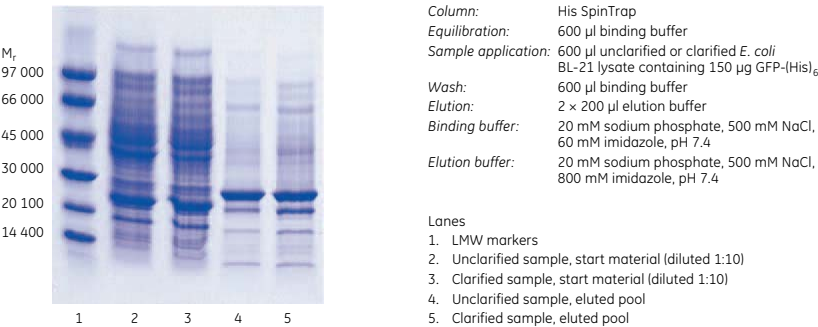


图17：还原条件下的SDS-PAGE（ExcelGelTM SDS Gradient8-18）电泳。样品为未净化和净化后表带有GFP-(His)6的大肠杆菌裂解物，未净化和净化后的样品有相似的纯度和回收率。

用HisTrap HP和HisTrap FF进行纯化

HisTrap HP 和HisTrap FF是1毫升和5毫升的HiTrap柱子，分别预装了Ni Sepharose High Performance或Ni Sepharose 6 Fast Flow柱材。上样、洗涤、洗脱过程可以用带有配套适配器的注射器、蠕动泵或者如ÅKTA design一样的层析系统完成（仪器选择请参见表8）。

HisTrap HP 和HisTrap FF的柱管由聚丙烯制成，具有生物兼容性并且不与生物分子发生相互作用。顶端和底端由多孔的聚乙烯烧结而成。柱子在运输时入口被塞子堵住，而出口被封死，但可以掰断。每个包装都含有所有用于把柱子连接到不同仪器上的必需配件。为快速放大纯化规模，两个或者三个HisTrap 柱子（1毫升或5毫升）可以串联使用（柱压会高些）。注意，HisTrap HP和HisTrap FF 柱不能打开或者再次填充。

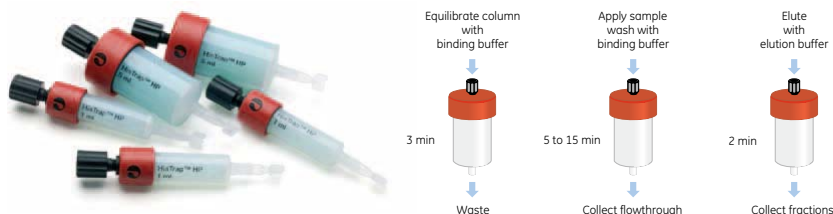


图18: HisTrap HP 和HisTrap FF 1ml和5ml柱子提供对组氨酸标签重组蛋白简单方便的一步纯化。HisTrap HP 1ml和5ml的柱子展示在这里，简单的纯化流程在右侧显示。

样品制备

通用的样品制备过程请参照26页。

通过加入缓冲液、氯化钠、咪唑和添加剂的浓储液，用结合缓冲液稀释样品，或者通过交换缓冲液等手段来调节样品适应结合缓冲液的组成和pH值。在样品和结合缓冲液中添加低浓度的咪唑对于防止有组氨酸暴露在外的主细胞蛋白结合在柱上是必要的（见第4章）。

在使用样品前一刻，将样品用0.22或0.45 μ m的滤膜过滤，并且（或者）离心。如果样品过于粘稠，为了防止堵塞柱子，需用结合缓冲液稀释样品、增加裂解操作（离心、匀浆）或加入DNase/RNase来降低核酸片断的大小。

准备缓冲液

结合缓冲液: 20mM 磷酸钠, 0.5M 氯化钠, 20-40mM 咪唑, pH7.4（最优的咪唑浓度是蛋白依赖的, 20-40mM 适合于大多数蛋白）

洗脱缓冲液: 20mM 磷酸钠, 0.5M 氯化钠, 500mM 咪唑, pH7.4

- 用于准备缓冲液的水和化学品应该是高纯的。用高纯的咪唑，这会在280nm处无紫外吸收或低吸收。
- 对于不同的蛋白，需要在样品和缓冲液中添加咪唑（以获得最好的纯度和产量）的浓度也会不同。在结合缓冲液中，20-40mM咪唑适合于大多数蛋白。洗脱缓冲液中的500mM咪唑能够保证目的蛋白的完全洗脱。
- 作为用咪唑洗脱的替换选择，可降低pH值至4.5（金属离子在pH低于4.0时会从介质中被剥离下来）。

纯化

1. 将注射器或泵管用蒸馏水装满。移除塞子，把柱子连接到注射器（用提供的接头）、蠕动泵或层析系统上。保持连接处一直有液体避免向系统中引入气泡。
2. 除掉柱子底部的密封。
3. 用3到5倍柱体积的去离子水洗去乙醇。
4. 用至少5个柱体积的结合缓冲液平衡柱子。建议流速是1ml/min（1毫升柱子）和5ml/min（5毫升柱子）。
5. 用注射器或者蠕动泵加入预处理的样品，为获得最好的结果，在上样时，用0.2-1ml/min（1毫升柱子）和0.5-5ml/min（5毫升柱子）的流速。
6. 用结合缓冲液洗涤至少5到10个柱体积，直到吸收达到平稳的基线或在流出物中没有物质流出。在洗涤的过程中保持流速为1-2 ml/min（1毫升柱子）和5-10 ml/min（5毫升柱子）。
7. 用洗脱缓冲液采用一步洗脱或者线性梯度洗脱。对于分步洗脱，通常5个柱体积即可。对于线性梯度洗脱，通常10到20个柱体积即可。在洗脱的过程中保持1-2 ml/min（1毫升柱子）和5-10ml/min（5毫升柱子）的流速。
8. 洗脱后，用3到5倍柱体积的结合缓冲液洗涤柱子。柱子即可用来进行下一次纯化。当使用注射器时，1ml/min对应于大概每分钟30滴（HitTrap 1毫升柱子），5ml/min对应于大概每分钟120滴（HitTrap 5毫升柱子）。

- 如果纯化同一蛋白，柱子不需要进行金属离子的剥离和重新装载的过程。重复使用任何的柱子都取决于样品的性质，同一柱子应该用来纯化相同的蛋白，以避免交叉污染。关于本话题以及柱子清洗和储存的更多信息请参见附录1。
- Ni Sepharose与还原剂兼容。然而，我们建议在加入含有还原剂的缓冲液/样品之前，除去任何弱结合的Ni²⁺离子。这可以通过用不含还原剂的一个空白运行来实现（见下文）。不要把HisTrap用含有还原剂的缓冲液保存。



在所有正常的情况下，从Ni Sepharose 上泄漏的Ni²⁺离子很少。该介质的泄漏比其他检测的预装载的IMAC介质都要低。

对于非常苛刻的应用，纯化过程中Ni的泄漏可以通过在上样前进行空白运行（见下文）而进一步降低。

空白运行

使用不含还原剂的结合缓冲液和洗脱缓冲液。

1. 用5个柱体积的蒸馏水洗涤柱子以除去20%乙醇。
2. 用5个柱体积的洗脱缓冲液洗涤。
3. 用10个柱体积的结合缓冲液平衡柱子。

应用案例

1. 用HisTrap HP从包涵体中单步柱上复性并纯化组氨酸标签重组蛋白

从大肠杆菌的包涵体中获得的变性溶解了的10ml (0.67mg/ml) 组氨酸标签单链Fv抗体片段Fab 57P, 用HisTrap 1ml柱复性并纯化。通过Biacore™ System 2000分析, 复性的得率为14% (见图19B)。复性的条件可以优化, 最终方案可以自动用HisTrapHP进行复性和纯化。图19A-C显示了复性、纯化和分析的结果。

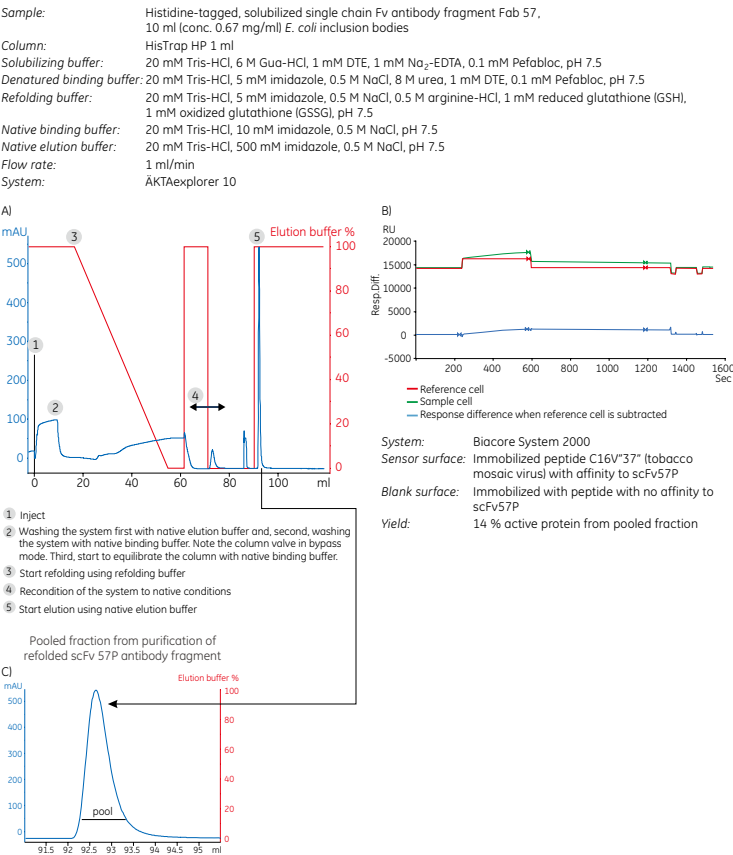


图19: A柱上复性和纯化。B固定的肽段和复性蛋白相互作用的感受器图谱。C从复性的scFv57P抗体片段纯化过程中所收取样品的放大图。

2. 用HisTrap HP两步纯化高分子量的组氨酸标签重组蛋白

高分子量的组氨酸标签的甘露聚糖酶Man 26A蛋白（来源于*Cellulomonas fimi*，分子量100000）用1ml的HisTrap HP柱以有活性的形式纯化出来（图20A）。第二步使用Superdex™ 200纯化，获得纯度为95%的蛋白（图B和图C）。

A. Affinity chromatography (AC)

Sample: 10 ml *E. coli* extract with low-level expression of a histidine-tagged mannanase, Man 26A, from *Cellulomonas fimi* ($M_r \sim 100\,000$)
Column: HisTrap HP 1 ml
Binding buffer: 20 mM sodium phosphate, 30 mM imidazole, 500 mM NaCl, pH 7.4
Elution buffer: 20 mM sodium phosphate, 500 mM imidazole, 500 mM NaCl, pH 7.4
Gradient: 25 ml linear gradient 30–300 mM imidazole
Flow rate: 1 ml/min
System: ÄKTAexplorer 100

B. Gel filtration (GF)

Sample: 0.5 ml concentrated sample from HisTrap HP 1-ml column
Column: Superdex 200 10/300 GL
Buffer: PBS, pH 7.5
Flow rate: 0.5 ml/min
System: ÄKTAexplorer 100

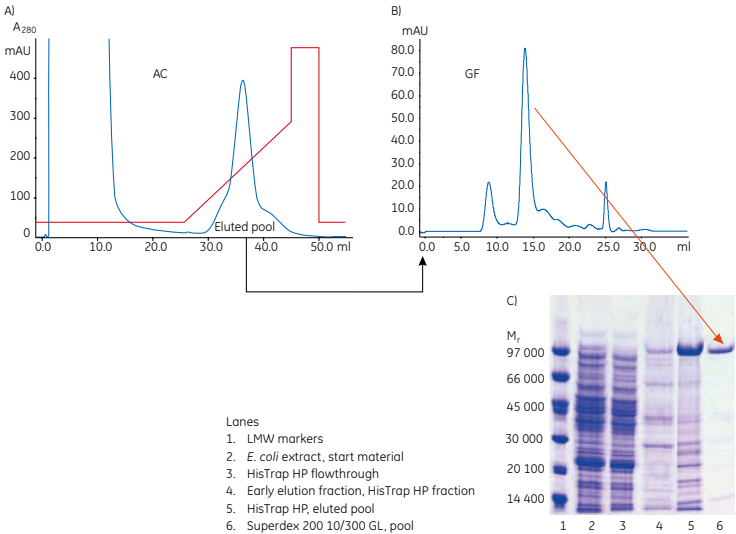


图20：A用HisTrap 1ml柱进行第一部亲和层析纯化。B用Superdex200 30/100进行第二步分子筛纯化。C SDS-PAGE结果。

3. 从HisTrap FF规模化放大到试样

从大肠杆菌的裂解物中提取组氨酸标记的麦芽糖结合蛋白MBP-(His)₆。分别含有8,40,160mg目的蛋白的样品上样到1ml HisTrap FF柱，5ml HisTrap FF柱，20mlHisPrep FF16/10柱。所有的柱子都在同样的线性流速下进行层析。结果显示，在同样的线性流速下运行，放大柱子的体积同样能够提供高度一致的结果（图21A到C）。选取的组分用SDS-PAGE分析，以纯度和回收率作为判据，结果几乎相同（图21D）。

从实验室放大到试样，需要结合更多的样品。规模化需要高结合（88%的柱子载量）MBP-(His)₆。高样品结合需要优化结合和洗涤条件，以避免在洗涤的过程中丢失目的蛋白。5mM浓度的咪唑能够给出最好的收率和纯度。用HisPrep FF16/10柱进行了两个分别的纯化，用以显示可重复性。然后，纯化方案被放大10倍，收集的组分用SDS-PAGE分析，以纯度和回收率作为判据，结果几乎相同（图22B）。

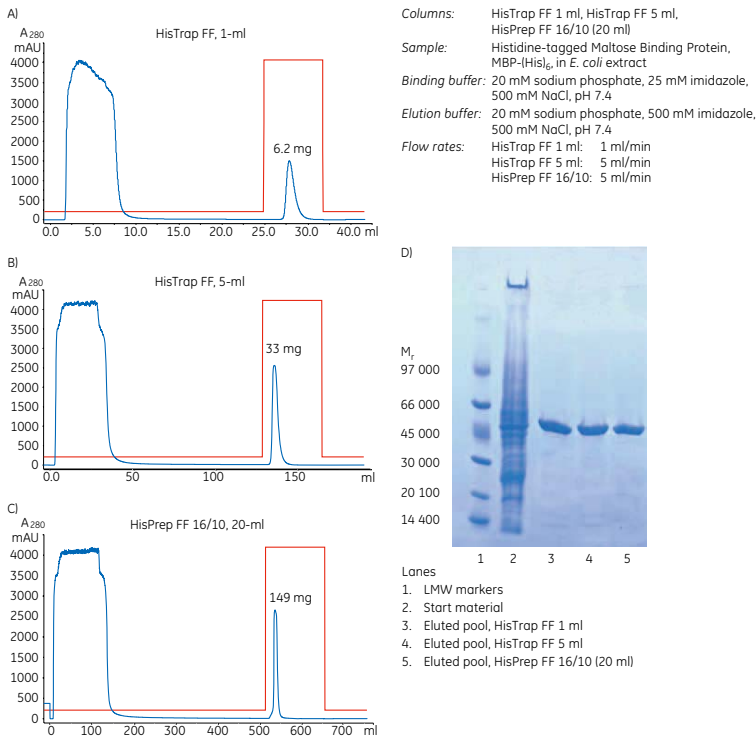


图21：从A（1mlHisTrap FF柱）到B（5mlHisTrap FF柱）到C（20mlHisPrep FF16/10柱）的放大过程。上样的样品分别包含大约8、40、160mgMBP-(His)₆蛋白。以mg为单位表示的回收率在每次层析图上标出。D，非还原条件条件的SDS-PAGE（ExcelGel SDS 梯度从8到18）显示从1ml放大到20ml的柱体积并不显著影响纯化结果。

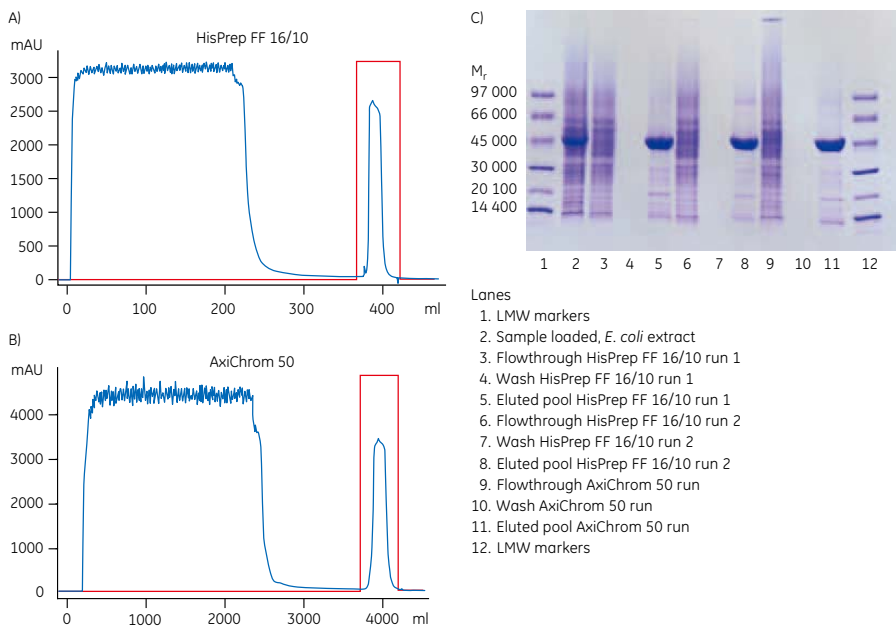


图22：从A（20ml HisPrep FF16/10柱）到B（210ml AxiChromTM50柱）的规模化放大。ÄKTA explorer 100用于进行在HisPrep FF16/10上的纯化，ÄKTA Pilot用于进行在AxiChrom50上的纯化。所有的系统都用UNICORN软件控制。注意，只有一次在HisPrep FF16/10上的运行展示出来。C，SDS-PAGE检测两种纯化的各种组分。

使用HisTrapFF在ÄKTAprime plus上进行纯化

这些过程使用HisTrap FF 1ml柱，但也可以使用HisTrap HP 1ml柱。

准备缓冲液

结合缓冲液（A1端口）：20mM 磷酸钠，0.5M 氯化钠，20mM咪唑，pH7.4

洗脱缓冲液（B端口）：20mM 磷酸钠，0.5M 氯化钠，500mM 咪唑 pH7.4

- 使用高纯度的水和化学药品配制溶液。在使用前用0.45 μ m的滤膜过滤所有的溶液。准备至少500ml的洗脱缓冲液。
- 在结合缓冲液中应该含有20-40mM浓度的咪唑，用以降低无组氨酸标签蛋白的非特异结合。咪唑的浓度是蛋白依赖的。如果目的蛋白在某个咪唑浓度下洗脱或不结合柱子，则降低咪唑浓度。

样品制备

通用的样品制备过程请参照26页。

- 通过加入缓冲液、氯化钠、咪唑和添加剂的浓储液，用结合缓冲液稀释样品，或者通过交换缓冲液等手段来使样品适应结合缓冲液的组成和pH值。在样品和结合缓冲液中添加低浓度的咪唑对于防止有组氨酸暴露在外的宿主细胞蛋白结合在柱上是必要的（见第4章）。
- 在使用样品前一刻，将样品用0.22或0.45 μ m的滤膜过滤，并且（或者）离心。如果样品过于粘稠，为防止堵塞柱子，需用结合缓冲液稀释样品、增加裂解操作（离心、匀浆）或加入DNase/RNase来降低核酸片断的大小。

系统准备

这个例子使用的是ÄKTAprime plus。一旦系统准备好，其余的步骤（从选择应用模版菜单中运行方法）就会自动进行。

- 将连接至A端口（8孔阀）的每个注入管放于结合缓冲液中，把连接至B端口（2孔阀）的注入管放于洗脱缓冲液中。
 - 将三根棕色的废液管放于废液缸中。
 - 将柱子连接至上样阀（7孔阀）的端口1和UV流动池之间。
 - 用18mm的管子填充部分收集器，将收集臂的白板紧靠在第一管外侧。
- 对于分步洗脱，需要插入部分收集器的管子数目随样品的体积而变化。用20根管子填充部分收集器，然后每毫升样品增加一根。比如，如果样品体积为10ml，则需要用20+10根管子填充。但是，需要注意部分收集器的最大载量是95管，所以，把样品的体积限制在75ml内。

对于梯度洗脱，最少要使用40根管。

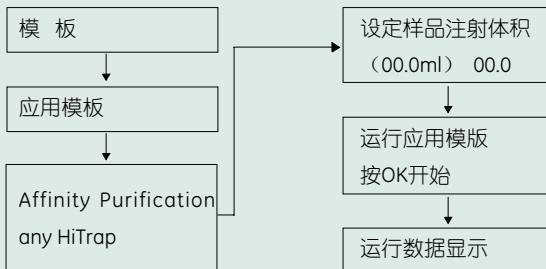
5. 在上样阀的2号和6号端口间连接上样环，上样环的体积和样品相比要足够大。用注射器手动填装上样环。

注：如果使用SuperloopTM，额外还需要参照Superloop附带的说明书。

如果纯化同一蛋白，柱子不需要进行金属离子的剥离和重新装载的过程。重复使用任何的柱子都取决于样品的性质，同一柱子应该用来纯化相同的蛋白，以避免交叉污染。关于本话题以及柱子清洗和储存的更多信息请参见附录1。

选择应用模版，开始运行逐步洗脱方法

1. 检查到PrimeviewTM的通信，在屏幕的右下角应该显示：“controlled by prime”。
2. 用箭头和OK按钮移动菜单树，直到找到“Affinity purification any HiTrap”。



3. 输入样品体积，按OK键运行模版。

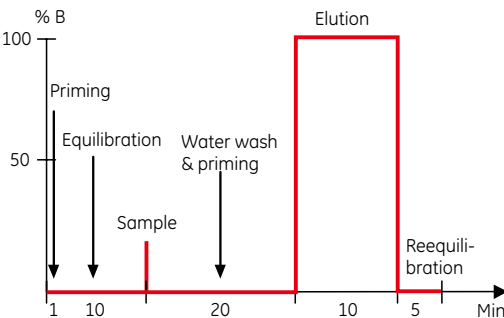
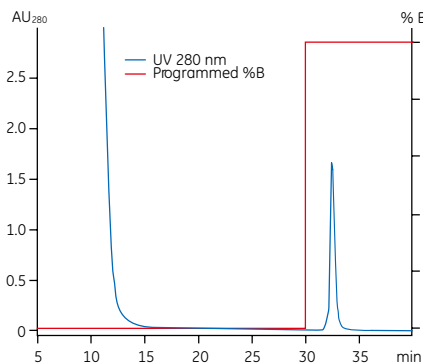


图23: Affinity purification any HiTrap模版的理论梯度。总共运行时间为47分钟+ 样品上样时间。

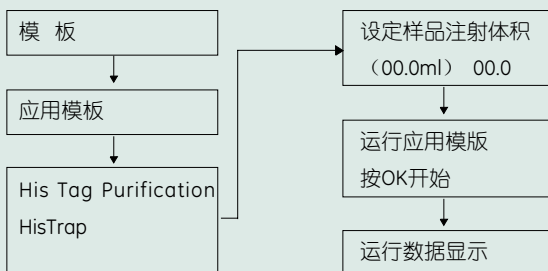


Sample: Clarified homogenate of *E. coli* expressing histidine-tagged protein
 Column: HisTrap HP 1 ml
 Binding buffer (port A1): 20 mM phosphate, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.4
 Elution buffer (port B): 20 mM phosphate, 0.5 M NaCl, 0.5 M imidazole, pH 7.4

图24: 组氨酸标签蛋白逐步洗脱的典型结果。

选择应用模版，开始运行梯度洗脱方法

1. 检查到Primeview的通信，在屏幕的右下角应该显示：“controlled by prime”。
2. 用箭头和OK按钮移动菜单树，直到找到“His Tag purification HisTrap”。



3. 输入样品体积，按OK键运行模版。

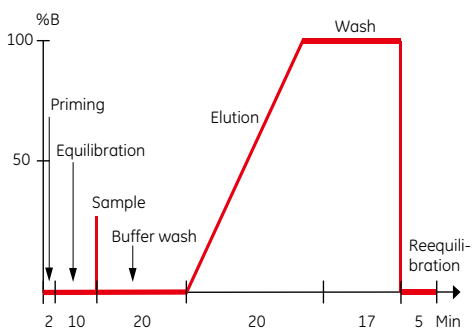


图25: His Tag purification HisTrap模版的理论梯度。总共运行时间为74分钟+ 样品上样时间。

time.

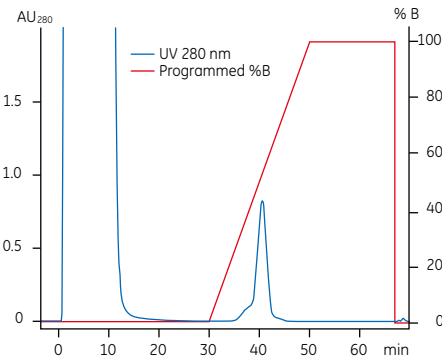


Fig 26. Typical result from gradient elution of a histidine-tagged protein.

Sample: Clarified homogenate of *E. coli* expressing histidine-tagged protein
Column: HisTrap HP 1 ml
Binding buffer (port A1): 20 mM phosphate, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.4
Elution buffer (port B): 20 mM phosphate, 0.5 M NaCl, 0.5 M imidazole, pH 7.4

图26： 组氨酸标签蛋白梯度洗脱的典型结果。

使用HisTrap FF crude从未净化的细胞裂解物中进行纯化

HisTrap FF crude是预装了Ni Sepharose 6 Fast Flow柱材的预装柱，用来纯化聚组氨酸标签的重组蛋白。细胞完全破碎后，可以把未净化的粗质细胞裂解物直接上样到柱子中而避免了离心和过滤样品的过程。

- 直接将未净化的样品上样减少了全部所需的纯化时间，可以增加纯化敏感蛋白而避免其失活的可能性。



图27: HisTrap FF crude 柱子能够进行简单的单步纯化组氨酸标签重组蛋白而不用离心和过滤。HisTrap FF crude柱用聚丙烯制成，具有生物兼容性并且不与生物分子发生相互作用。运输时，柱子在入口有塞子，在出口有一掰即断的封口。柱子顶部和底部有多孔聚乙烯，孔径的大小已经经过优化，确保既能把未净化的样品直接上样而不增加柱压，又能避免Ni Sepharose 6 Fast Flow柱材不会泄露。柱子可以用提供的连接器和注射器、蠕动泵或诸如ÄKTAdesign的层析系统一同操作。注意，HisTrap FF crude柱子不能被打开或者重新填装。

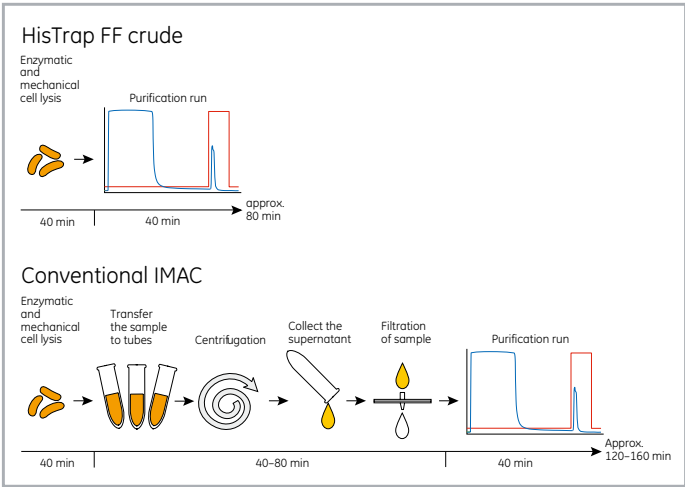


图28: HisTrapFF crude和通常的IMAC相比，节省纯化组氨酸标签重组蛋白的时间。

样品制备

通用的样品制备过程请参照26页。

 为直接上样未净化的样品，将细胞完全破碎从而避免增加柱压十分重要。

下述的方法成功应用在我们自己的实验室中。其它建立好的方法可能也会奏效。

1. 稀释细胞团：向每克细胞团中加入5-10ml结合缓冲液，为了避免带有暴露组氨酸的宿主细胞蛋白的结合，在样品和结合缓冲液中加入低浓度的咪唑十分重要（见第4章）。
酶消化裂解：加入0.2mg/ml的溶菌酶，20 μ g/ml的DNase，1mM MgCl₂，1mM Pefablab SC或PMSF。磁力搅拌30分钟。可以在4° C或室温进行，取决于目的蛋白的敏感程度。
2. 机械破碎：在冰上超声大概10分钟或用French Press或其它匀浆器匀浆或反复冻融，至少5次。
3. 机械裂解的时间可以比标准的操作程序延长，以确保样品被完全破碎，以便直接上样（避免堵塞柱子和增加柱压）。不同蛋白对细胞裂解的敏感程度不同，要注意避免发泡和样品过热。
4. 调节裂解物的pH值：不要使用强碱或强酸来调节pH值（防止沉淀）。制备后将未净化的样品直接上样。

 尚未净化的超声或匀浆过的裂解物在使用前被冷冻可能会增加沉淀和聚集。重新对裂解物超声可以避免在上样时增加柱压。

准备缓冲液

结合缓冲液：20mM 磷酸钠，500mM 氯化钠，20-40mM 咪唑，pH7.4（最优的咪唑浓度是蛋白依赖的，20-40mM 适合于大多数蛋白）

洗脱缓冲液：20mM 磷酸钠，500mM NaCl，500mM 咪唑 pH7.4

 对于不同的蛋白，需要在样品和缓冲液中添加咪唑（以获得最好的纯度和产量）的浓度也会不同。在结合缓冲液中，20-40mM咪唑适合于大多数蛋白。洗脱缓冲液中的500mM咪唑能够保证目的蛋白的完全洗脱。使用高纯度的咪唑，这会在280nm处无紫外吸收或低吸收。

 作为用咪唑洗脱的替换选择，可降低pH值至4.5（金属离子在pH低于4.0时会从介质中被剥离下来）。

纯化

1. 将注射器或泵管装满蒸馏水。移除塞子，把柱子连接到注射器（用提供的接头）、蠕动泵或层析系统上。保持连接处一直有液体避免向系统中引入气泡。
2. 除掉柱子底部的密封。
3. 用3到5倍柱体积的去离子水洗去乙醇。

4. 用至少5个柱体积的结合缓冲液平衡柱子。建议流速为1ml/min（1ml柱子）和5ml/min（5ml柱子）。
5. 用注射器或者蠕动泵加入未净化的样品。通常未净化样品的上样体积（高度取决于样品自身，样品预处理、上样时的温度）：
HisTrap FF crude 1ml：最多100ml。
HisTrap FF crude 5ml：最多500ml。

注意蛋白结合容量同样可能限制所能加入的样品量。

在上样的过程中，建议持续搅拌以避免沉降现象。在40℃上样可能会增加样品的粘度。样品粘度增加的副作用就是会在少量样品上样后就使柱子达到最大柱压。大体积也会增加柱压，导致用注射器上样更加困难。

6. 用结合缓冲液洗涤直到吸收达到平稳的基线（一般来说至少5到10个柱体积）。
7. 用洗脱缓冲液采用一步洗脱或者线性梯度洗脱。对于分步洗脱，通常5个柱体积即可。对于线性梯度洗脱，通常10到20个柱体积即可。
8. 洗脱后，用3到5倍柱体积的结合缓冲液洗涤柱子。柱子即可用来进行下一次纯化。

如果纯化同一蛋白，柱子不需要进行金属离子的剥离和重新装载的过程。重复使用任何的柱子都取决于样品的性质，同一柱子应该用来纯化相同的蛋白，以避免交叉污染。关于本话题以及柱子清洗和储存的更多信息请参见附录1。

未净化的样品可能增加纯化过程中气泡的形成。如果发生这种问题，可以在层析系统中加装一个限流器以防止这种现象的发生。如果加装了限流阀，需要把ÄKTA design系统的限压改为0.5MPa（5bar）。（柱子的压力为0.3 MPa，限流阀的压力为0.2 MPa）

Ni Sepharose与还原剂兼容。然而，我们建议在加入含有还原剂的缓冲液/样品之前，除去任何弱结合的Ni²⁺离子。这可以通过用不含还原剂的一个空白运行来实现（见下文）。不要把HisTrap FF crude柱子用含有还原剂的缓冲液保存。

在所有正常的情况下，从Ni Sepharose 上泄漏的Ni²⁺离子很少。该介质的泄漏比其他检测的预装载的IMAC介质都要低。

对于非常苛刻的应用，纯化过程中Ni的泄漏可以通过在上样前进行空白运行（见下文）而进一步降低。

空白运行

使用不含还原剂的结合缓冲液和洗脱缓冲液。

1. 用5个柱体积的蒸馏水洗涤柱子以除去20%乙醇。
2. 用5个柱体积的洗脱缓冲液洗涤。
3. 用10个柱体积的结合缓冲液平衡柱子。

应用案例

1. 用 HisTrap FF crude纯化在毕氏酵母中低表达的组氨酸标签重组蛋白

HisTrap FF crude非常适合纯化在宿主细胞（比如毕氏酵母）中低表达的蛋白。使用HisTrap FF crude，可以从毕氏酵母未净化的粗裂解物中获得高纯度蛋白。

图29显示了纯化在毕氏酵母中低表达的组氨酸标签的酿酒酵母水解酶。从未净化样品中纯化得到的蛋白用SDS-PAGE检测纯度很高。

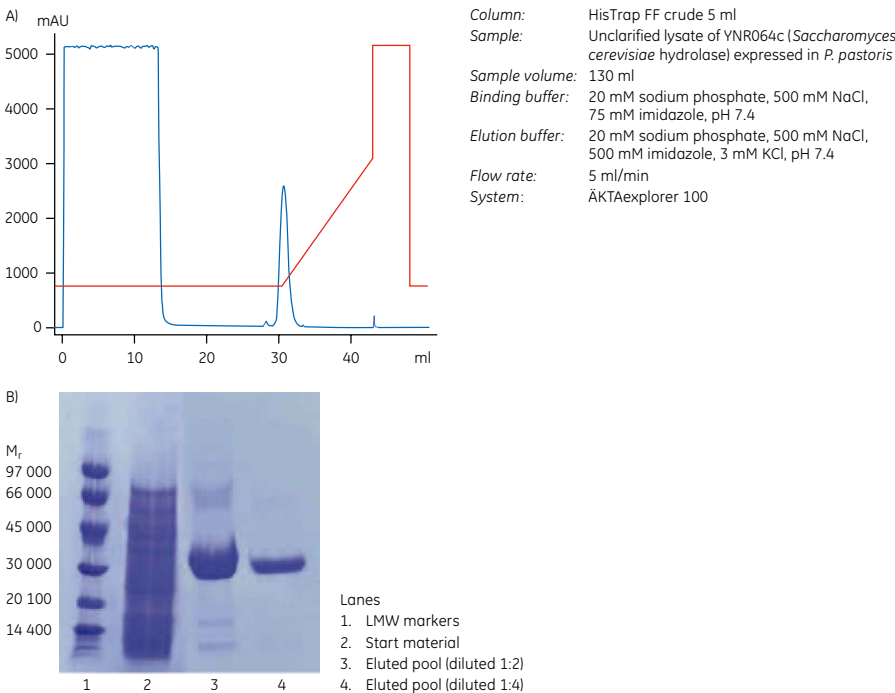


Fig 29. (A) Purification of an unclarified sample of histidine-tagged *Saccharomyces cerevisiae* hydrolase expressed in *P. pastoris* on HisTrap FF crude 5 ml. (B) SDS-PAGE under nonreducing conditions (ExcelGel SDS Gradient 8-18) shows the high purity obtained of the low-level expression protein.

图29：（A）用HisTrap FF crude 5ml柱子纯化在毕氏酵母中低表达的组氨酸标签的酿酒酵母水解酶。（B）非还原条件下的SDS-PAGE电泳（ExcelGel SDS Gradient8-18）显示获得的高纯度的地表达蛋白。

2. 从1ml到5ml HisTrap FF crude柱的规模化放大

该实验将HisTrap FF crude柱从1ml规模化放大到5ml。样品是含有MBP-（His）₆的未净化大肠杆菌裂解物，该裂解物是在样品上柱前用酶消化联合匀浆获得的。样品分别包含大概8mg和40mg的蛋白，使用1ml和5ml柱子。

SDS-PAGE显示从两个柱子上获得的蛋白的纯度和得率（毫克蛋白/每毫升柱材）基本相同。

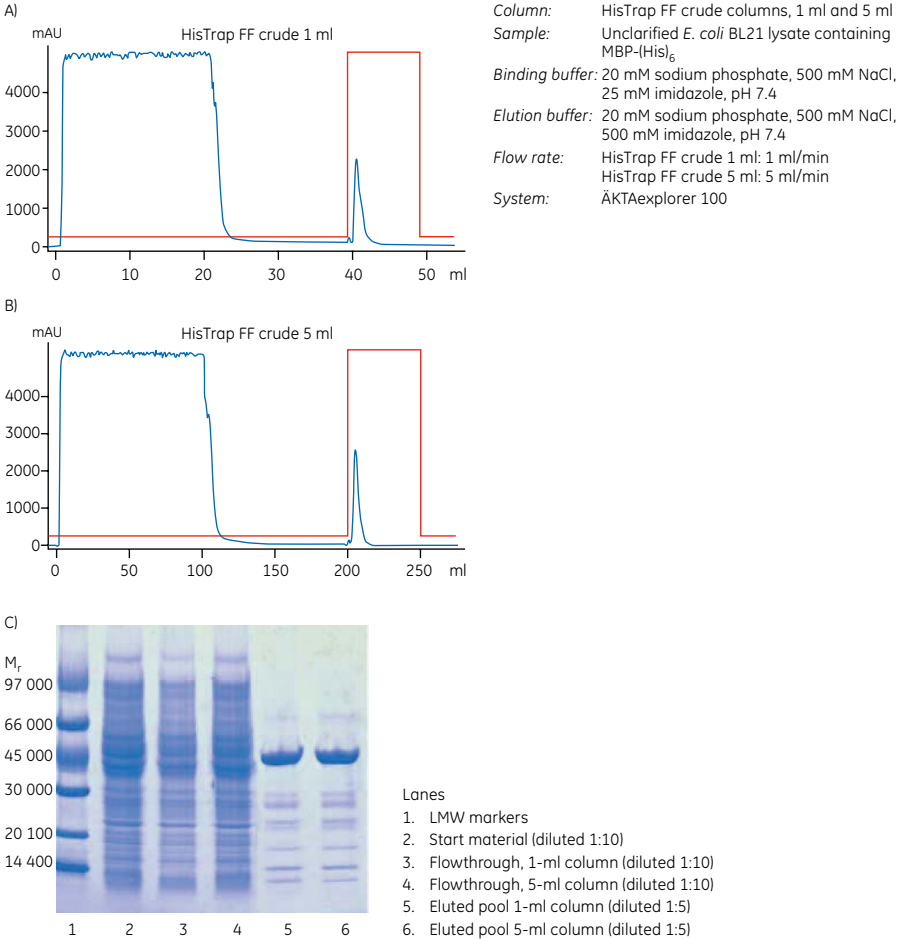
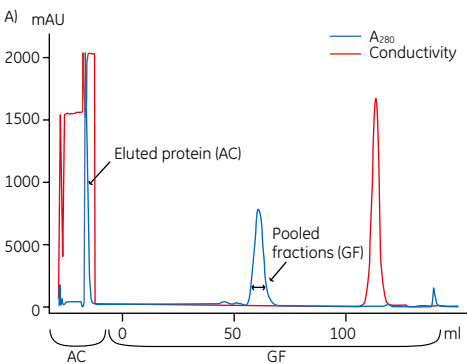


图30：从（A）1ml到（B）5mlHisTrap FF crude柱的规模化放大。1ml柱和5ml柱的得率分别为6.3mg和35.2mg。（C）非还原条件下的SDS-PAGE电泳（ExcelGel SDS Gradient8-18）显示规模化放大的过程并没有显著的影响纯化结果。

3. 用HisTrap FF crude进行自动多步纯化

HisTrap FF crude可用在ÄKTAexpress的层析系统（比如ÄKTAexpress）上进行组氨酸标签重组蛋白的高通量纯化。ÄKTAexpress可以自动用不同的多步纯化方案平行纯化组氨酸标签重组蛋白。UNICORN控制软件提供的方法向导使编制不同的纯化方案变得十分简单。图31显示从未净化的大肠杆菌裂解物中自动进行两步纯化MBP-(His)₆。第一步纯化方案是用HisTrap FF crude 1ml柱进行亲和层析。从亲和层析洗脱的峰被自动的收集到上样环中，然后上样到HiLoad TM16/60 Superdex 75 pg凝胶过滤柱上进行第二步的凝胶过滤层析。从凝胶过滤层析所收集的各组分纯度用SDS-PAGE进行检测（图31B）。

结果显示，HisTrap FF crude和ÄKTAexpress连用显著节省了纯化组氨酸标签重组蛋白的时间，并且未损失样品的纯度。



Affinity chromatography (AC) conditions

Column: HisTrap FF crude 1 ml
Sample: Unclassified *E. coli* BL21 lysate containing MBP-(His)₆
Binding buffer: 20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, 25 mM imidazole, pH 7.4
Elution buffer: 20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 7.4
Flow rate: 1 ml/min
System: ÄKTAexpress

Gel filtration (GF) conditions

Column: HiLoad 16/60 Superdex 75 pg
Buffer: 10 mM sodium phosphate, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4
Flow rate: 1.5 ml/min
System: ÄKTAexpress

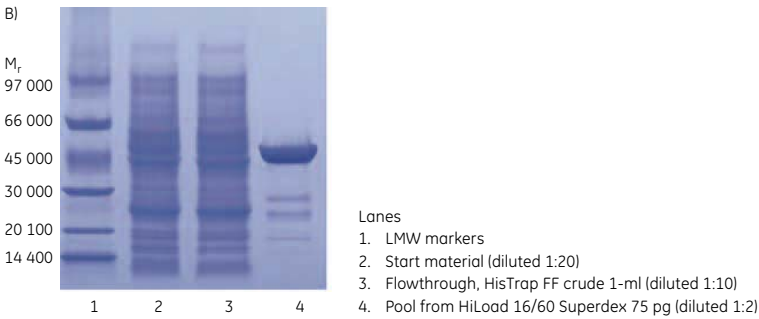


图31：（A）在ÄKTAexpress系统上，从未净化的大肠杆菌裂解物中自动的使用HisTrap FF crude和HiLoad 16/60 Superdex 75 pg进行两步纯化。（B）非还原条件下进行的SDS-PAGE电泳（ExcelGel SDS Gradient8-18）

使用注射器和HisTrap FF crude试剂盒进行纯化

HisTrap FF crude试剂盒被设计使用注射器和预先配制好的溶液快速、方便地纯化组氨酸标签重组蛋白。组氨酸标签重组蛋白可以直接从未净化的细胞裂解物中制备，这样可以省掉预处理样品的时间，并且增加目的蛋白的活力。

该试剂盒包含3根可以立即使用的HisTrap FF crude 1ml柱子（其中装有Ni Sepahrose 6 Fast Flow柱材）、浓缓冲液、一个5毫升注射器和连接头。试剂盒提供足够体积的浓缓冲液可以用注射器进行10-12次纯化。柱子的独特设计加上Ni Sepahrose 6 Fast Flow提供了一种方便、快速、简单、可重复性的分离手段。注意，HisTrap FF crude柱子不能被打开或者重新灌装。

直接将未净化的样品上样减少了全部所需的纯化时间，可以增加纯化敏感蛋白而避免其失活的可能性。



图32：HisTrap FF crude试剂盒提供对组氨酸标签重组蛋白方便、简单的纯化。

样品制备

通用的样品制备过程请参照26页。

 为直接上样未净化的样品，将细胞完全破碎从而避免增加柱压十分重要。

如下的方法成功应用在我们自己的实验室中。其它建立好的方法可能也会奏效。

1. 稀释细胞团：向每克细胞团中加入5到10ml的结合缓冲液，为了避免带有暴露组氨酸的宿主细胞蛋白的结合，在样品和结合缓冲液中加入低浓度的咪唑很重要（见第4章）。
2. 酶消化裂解：加入0.2mg/ml的溶菌酶，20 μ g/ml的DNase，1mM MgCl₂，1mM Pefablab SC或PMSF。磁力搅拌30分钟。可以在4° C或室温进行，取决于目的蛋白的敏感程度。
3. 机械破碎：冰上超声大约10分钟或用French Press或其它匀浆器匀浆或反复冻融，至少5次。

机械裂解的时间可以比标准的操作程序延长，以确保样品完全破碎，以便直接上样（避免堵

塞柱子和增加柱压)。不同的蛋白对细胞裂解的敏感程度不同,要注意避免发泡和样品过热。

4. 调节裂解物的pH值: 不要使用强碱或强酸调节pH值(防止沉淀)。制备后将未净化的样品直接上样。

尚未净化的超声或匀浆过的裂解物在使用前冷冻可能会增加沉淀和聚集。重新对裂解物超声可以避免在上样时增加柱压。

准备缓冲液

结合缓冲液: 将3ml的磷酸缓冲液(试剂盒中的8倍浓溶液)和0.24ml的2M咪唑混合,加水到24ml。检查pH值,如果需要的话将其调节到pH7.4到7.6。配好的缓冲液含有20mM磷酸盐, 0.5M 氯化钠, 20mM 咪唑。

洗脱缓冲液: 将1ml的磷酸缓冲液(试剂盒中的8倍浓溶液)和2ml的2M咪唑混合,加水到8ml。检查pH值,如果需要的话将其调节到pH7.4到7.6。配好的缓冲液含有20mM 磷酸盐, 0.5M 氯化钠, 500mM 咪唑。

浓溶液中的高盐浓度可能会导致在低温时形成晶体。这些晶体在室温会溶解。因此,我们建议浓溶液储液在使用前需要使其温度达到室温。盐晶的形成及其在室温的溶解不影响产品的性能。

表10 提供了50ml缓冲液的配制表。为使缓冲液中的咪唑达到表中第一列所示的浓度,需要根据表中的体积混合8倍磷酸缓冲液浓溶液, 2M的咪唑和蒸馏水。检查pH值, 如果需要的话将其调节到pH7.4到7.6。配好的缓冲液会包含20mM磷酸盐, 500mM氯化钠, 以及所示的咪唑浓度。对于一次纯化, 24ml的结合缓冲液和8ml的洗脱缓冲液是足够的。

表10: 50ml缓冲液的配制表。

缓冲液中咪唑浓度 mM	8×pH7.4的磷酸缓冲 液储液ml	2M pH7.4的咪唑 ml	去离子水 ml
0	6.25	0	加到50ml
10	6.25	0.25	加到50ml
20	6.25	0.50	加到50ml
30	6.25	0.75	加到50ml
40	6.25	1.00	加到50ml
50	6.25	1.25	加到50ml
60	6.25	1.50	加到50ml
70	6.25	1.75	加到50ml
80	6.25	2.00	加到50ml
90	6.25	2.25	加到50ml
100	6.25	2.50	加到50ml
150	6.25	3.75	加到50ml
200	6.25	5.00	加到50ml
250	6.25	6.25	加到50ml
300	6.25	7.50	加到50ml
400	6.25	10.00	加到50ml
500	6.25	12.50	加到50ml

 Ni Sepharose与还原剂兼容。然而，我们建议在加入含有还原剂的缓冲液/样品之前，除去任何弱结合的Ni²⁺离子。这可以通过用不含还原剂的一个空白运行来实现（见下文）。不要将HisTrap FF crude用含有还原剂的缓冲液保存。

 在所有正常的情况下，从Ni Sepharose 上泄漏的Ni²⁺离子很少。该介质的泄漏比其他检测的预装载的IMAC介质都要低。

对于非常苛刻的应用，纯化过程中Ni的泄漏可以通过在上样前进行空白运行（见下文）而进一步降低。

空白运行

使用不含还原剂的结合缓冲液和洗脱缓冲液。

1. 用5个柱体积的蒸馏水洗涤柱子以除去20%乙醇。
2. 用5个柱体积的洗脱缓冲液洗涤。
3. 用10个柱体积的结合缓冲液平衡柱子。

基本蛋白纯化

 如果高产量比高纯度更重要，采用如下的实验方案，如果高纯度更重要，使用下一部分的优化方案。

1. 用提供的缓冲液浓溶液准备24ml的结合缓冲液。
2. 用提供的缓冲液浓溶液准备8ml的洗脱缓冲液。
3. 用蒸馏水充满注射器，移除塞子，把柱子用提供的Luer接头连接到注射器上，保持接头处有液体，避免向柱子中引入气泡。如果在柱子中发现有气泡，用蒸馏水冲洗，直到气泡消失。
4. 掰掉底部封口，用5ml蒸馏水洗涤柱子。
5. 使用注射器，用5-10ml的结合缓冲液平衡柱子。
6. 用注射器将未净化的裂解物上样，收集穿透组分。对于大体积样品（多于15ml），用泵（比如P-1型蠕动泵），采用3ml/min的流速上样会比较方便。

 在4° C上样可能会增加样品的粘度。样品粘度增加的副作用就是会在少量样品上样后就使柱子达到最大柱压。大体积也会增加柱压，导致用注射器上样更加困难。通常的未净化样品上样体积（高度取决于样品自身，样品预处理和上样时的温度）最多为100ml。

7. 用10ml结合缓冲液洗涤柱子，收集穿透。
8. 用5ml洗脱缓冲液洗脱。为了避免稀释样品，每1ml洗脱物收集为一个组分。
9. 检测纯化所得蛋白的不同组分（比如用SDS-PAGE和/或蛋白免疫印迹）。纯化的蛋白一般会在第二和第三毫升洗脱组分中。

 如果需测量280nm的吸收，请用洗脱缓冲液作为参比。如需要把咪唑从蛋白中除去，请使用Hitrap Desalting、HiPrep 26/10 Desalting或PD-10 Desalting脱盐柱。

10. 洗脱后，通过用10个柱体积的结合缓冲液洗涤以再生柱子。随后柱子即可用来进行下一次纯化。

-  如果纯化同一蛋白，柱子不需要进行金属离子的剥离和重新装载的过程。重复使用任何的柱子都取决于样品的性质，同一柱子应该用来纯化相同的蛋白以避免交叉污染。关于本话题以及柱子清洗和储存的更多信息请参见附录1。

优化蛋白纯化

-  当需要较高纯度时可采用如下的逐步洗脱方案。

当下次纯化同样的蛋白时，洗脱的步骤可以减少到和基本蛋白纯化方法相同，只是需要采用在本方案中选择的咪唑浓度。

1. 准备结合缓冲液和5个梯度的洗脱缓冲液，咪唑浓度从40mM 到500mM 递增，检测配好溶液的pH值，如果需要的话将其调节到pH7.4到7.6。缓冲液的配制表参见表10。
2. 用蒸馏水充满注射器，移除塞子，把柱子用提供的Luer接头连接到注射器上，保持接头处有液体，避免向柱子中引入气泡。如果在柱子中发现有气泡，用蒸馏水冲洗，直到气泡消失。
3. 掰掉底部封口，用5ml蒸馏水洗涤柱子。
4. 使用注射器，用5-10ml的结合缓冲液平衡柱子。
5. 用注射器将未净化的裂解物上样，收集穿透组分。对于大体积样品（多于15ml），用泵（比如P-1型蠕动泵），采用3ml/min的流速上样会比较方便。
在4° C上样可能会增加样品的粘度。样品粘度增加的副作用就是会在少量样品上样后就使柱子达到最大柱压。大体积也会增加柱压，导致用注射器上样更加困难。通常的未净化样品上样体积（高度取决于样品自身，样品预处理和上样时的温度）最多为100ml。
6. 用10ml结合缓冲液洗涤柱子，收集穿透。
7. 用5ml第一个咪唑浓度的洗脱缓冲液洗脱。为了避免稀释样品，每1ml洗脱物收集为一个组分。
8. 继续用第二个咪唑浓度的洗脱缓冲液洗脱（比如，用5ml含有60mM咪唑的洗脱缓冲液洗脱）。每1ml洗脱物收集为一个组分。
9. 同步骤7、8，继续用更高咪唑浓度的洗脱缓冲液洗脱。纯化的蛋白大多在每次洗脱的第二或第三个组分中。
10. 检测纯化所得蛋白的不同组分（比如用SDS-PAGE和/或蛋白免疫印迹）。

-  如果需测量280nm的吸收，请用洗脱缓冲液作为参比。如需要把咪唑从蛋白中除去，请使用Hitrap Desalting、HiPrep 26/10 Desalting或 PD-10 Desalting脱盐柱。

11. 洗脱后，通过用10个柱体积的结合缓冲液洗涤以再生柱子。随后柱子即可用来进行下一次纯化。

-  如果纯化同一蛋白，柱子不需要进行金属离子的剥离和重新装载的过程。重复使用任何的柱子都取决于样品的性质，同一柱子应该用来纯化相同的蛋白以避免交叉污染。关于本话题以及柱子清洗和储存的更多信息请参见附录1。

以上纯化的结果提供含有最优化的结合和洗脱缓冲液配方的信息。最优的洗脱缓冲液是能够洗脱组氨酸标签重组蛋白的缓冲液。最优的结合缓冲液和洗脱缓冲液配方应采用目的蛋白洗脱的前一步洗脱缓冲液所用的咪唑浓度，最优的洗脱缓冲液相比，具有稍低些的咪唑浓度。在结合缓冲液中使用尽可能高的咪唑浓度就会尽可能地提高获得的蛋白的纯度。下次纯化相同蛋白时，就应该使用这些缓冲液。

结合缓冲液中咪唑的浓度是用来防止宿主细胞蛋白非特异的结合在柱子上，而不使组氨酸标签重组蛋白洗脱。决定这个浓度通常比决定洗脱缓冲液中咪唑的浓度更加重要。500mM浓度的咪唑在大多数情况下都可以用来洗脱。

应用案例

用HisTrap FF crude试剂盒进行纯化

HisTrap FF crude试剂盒进行纯化含有3根可以立即使用的HisTrap FF crude 1ml柱子、缓冲液浓溶液、一个注射器、连接头和说明书。试剂盒可以在几分钟内用简单的、四步过程从未净化的细胞裂解物中进行纯化。

1. 裂解含有组氨酸标签重组蛋白的细胞。
2. 用混合和稀释缓冲液浓溶液来准备缓冲液。
3. 用注射器上样，洗涤和洗脱目的蛋白。
4. 用SDS-PAGE检测纯度。

如图33所示，MBP-(His)₆用HisTrap FF crude试剂盒提供的注射器、缓冲液和HisTrap FF crude 1ml柱子被高效纯化。

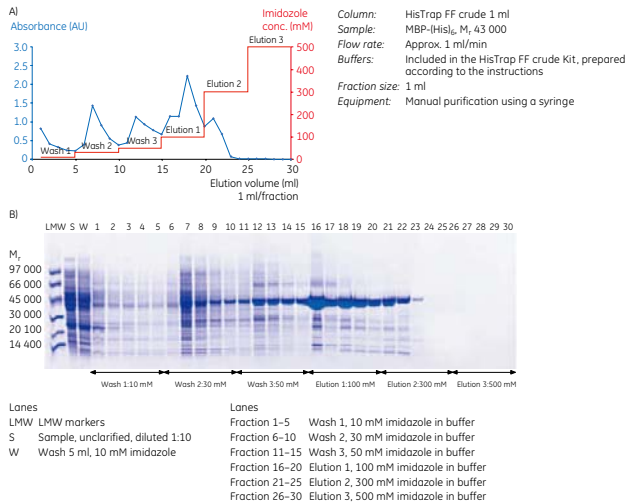


图33: (A) 用HisTrap FF crude试剂盒纯化MBP-(His)₆蛋白。(B) SDS-PAGE 电泳 (ExcelGel SDS Gradient8-18) 检测每个1ml洗脱组分。

用His GraviTrap和His GraviTrap Kit进行重力流纯化

His GraviTrap柱子被设计用来使用重力流进行快速、简单地纯化组氨酸标签重组蛋白。已净化和未经净化的样品都可以上样。柱子预装了Ni Sepahrose 6 Fast Flow柱材。特制的玻璃板使柱子在纯化过程中免于流干。用His GraviTrap进行纯化的典型耗时大概为30分钟（取决于样品的体积和溶液的浓度）。



图34: His GraviTrap连接到LabMate PD-10溶液池上，可以方便的进行平衡、样品上样和洗涤过程。His GraviTrap柱子以一种包装的形式运输，可以转换成放置于柱子架上就可进行简单纯化的形式。LabMate™ PD-10溶液池可以连接到柱子上，进行方便操作体积大于10ml的样品。可以联合使用His Buffer Kit以获得最优的性能。

His GraviTrap和His Buffer Kit的好处综合于His GraviTrap Kit中。它包含了两个包装的His GraviTrap和一个包装的His Buffer Kit。His GraviTrap Kit含有可以进行20次纯化的柱子和缓冲液。

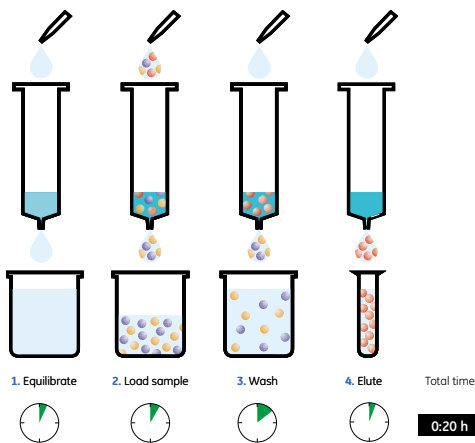


图35: 用His GraviTrap纯化组氨酸标签重组蛋白是一种简单快速的四步过程。

样品制备

通用的样品制备过程请参照26页。

 为直接上样未净化的样品，将细胞完全破碎从而避免增加柱压很重要。

1. 1如下的方法成功应用于我们自己的实验室中。其它建立好的方法可能也会奏效。
2. 稀释细胞团：向每克细胞团中加入5到10ml的结合缓冲液，为了避免带有暴露组氨酸的宿主细胞蛋白的结合，在样品和结合缓冲液中加入低浓度的咪唑很重要（见第4章）。
3. 酶消化裂解：加入0.2mg/ml的溶菌酶，20µg/ml的 DNase，1mM MgCl₂，1mM Pefablab SC或PMSF。磁力搅拌30分钟。可以在4° C或室温进行，取决于目的蛋白的敏感程度。
机械破碎：冰上超声大概10分钟或用French Press或其它匀浆器匀浆或反复冻融，至少5次。
机械裂解的时间可以比标准的操作程序延长，以确保样品完全破碎，以便直接上样（避免堵住柱子和增加柱压）。不同的蛋白对细胞裂解的敏感程度不同，要注意避免发泡和样品过热。
4. 调节裂解物的pH值：不要使用强碱或强酸来调节pH值（防止沉淀）。制备后将未净化的样品直接上样。

 尚未净化的超声或匀浆过的裂解物在使用前冷冻可能会增加沉淀和聚集。重新对裂解物超声可以避免在上样时增加柱压。

准备缓冲液

结合缓冲液：20mM 磷酸钠，500mM 氯化钠，20-40mM 咪唑，pH7.4（最优的咪唑浓度是蛋白依赖的，20-40mM 适合于大多数蛋白）

洗脱缓冲液：20mM 磷酸钠，500mM 氯化钠，500mM 咪唑 pH7.4

 对于不同的蛋白，需要在样品和缓冲液中添加咪唑（以获得最好的纯度和产量）的浓度也会不同。在结合缓冲液中，20-40mM咪唑适合于大多数蛋白。洗脱缓冲液中的500mM咪唑能够保证目的蛋白的完全洗脱。

 作为用咪唑洗脱的替换选择，可以降低pH值至4.5（金属离子在pH低于4.0时会从介质中被剥离下来）。

纯化

1. 1去掉底部封口，移除顶部盖子，倒掉多余的液体，把柱子放在Workmate柱子架上。如果需要，在柱子顶部加载LabMate漏斗。
2. 用10ml结合缓冲液平衡柱子。玻璃板可以防止柱子在纯化过程中流干。
3. 加入0.5-35毫升准备好的样品。

 柱子的蛋白载量较高（每根柱子大约能结合40mg蛋白），然而载量是蛋白依赖的。

4. 用10ml结合缓冲液洗涤。

5. 加入3ml洗脱缓冲液，收集洗脱样品。在变性条件下，用3ml洗脱缓冲液洗脱两次。

 如果使用含有变性剂的缓冲液或粘性溶液，在室温进行纯化。

 Ni Sepharose与还原剂兼容。然而，我们建议在加入含有还原剂的缓冲液/样品之前，除去任何弱结合的Ni²⁺离子。这可以通过用不含还原剂的一个空白运行来实现（见下文）。不要把His GraviTrap用含有还原剂的缓冲液保存。

 在所有正常的情况下，从Ni Sepharose 上泄漏的Ni²⁺离子很少。该介质的泄漏比其他检测的预装载的IMAC介质都要低。

对于非常苛刻的应用，纯化过程中Ni的泄漏可以通过在上样前进行空白运行（见下文）而进一步降低。

空白运行

使用不含还原剂的结合缓冲液和洗脱缓冲液。

1. 用5个柱体积的蒸馏水洗涤柱子以除去20%乙醇。

2. 用5个柱体积的洗脱缓冲液洗涤。

3. 用10个柱体积的结合缓冲液平衡柱子。

应用案例

用His GraviTrap快速纯化高分子量组氨酸标签蛋白

His GraviTrap预装有Ni Sepahrose 6 Fast Flow柱材，可以在不需要泵和纯化系统的情况下快速简单地纯化组氨酸标签重组蛋白。单根柱子能够在仅仅20到25分钟内纯化大概40mg蛋白。大体积的净化或未净化的样品可以简单地上样，纯化的蛋白能够以很小的体积洗脱，最后获得高浓度的目的蛋白。

在这个例子中，20ml含有(His)₁₀-TRX-P450（分子量大概130 000）蛋白的JM109大肠杆菌裂解物在25分钟内被纯化，并且用SDS-PAGE和蛋白免疫印迹分析（图36A-B）。SDS-PAGE显示在洗脱的组分中有三条主要蛋白带。蛋白免疫印迹分析和N端测序（结果未显示）确认了洗脱的组分中三条主要蛋白带都带有组氨酸标签。低分子量的带是组氨酸标签重组蛋白的截短形式。

Method:
Equilibration: 10 ml binding buffer (including 40 mM imidazole)
Sample application: 20 ml sample (including 40 mM imidazole)
Wash: 2 × 10 ml binding buffer (including 40 mM imidazole)
Elution: 2 × 3 ml elution buffer

Western blot:
Electrophoresis and transfer: PhastSystem™ and PhastGel™ Gradient 10-15
Membrane: Hybond ECL
Primary antibody: Anti-His antibody (mouse)
Secondary antibody: Anti-mouse IgG, HRP-linked
Detection: Colorimetric, DAB-enhanced liquid substrate

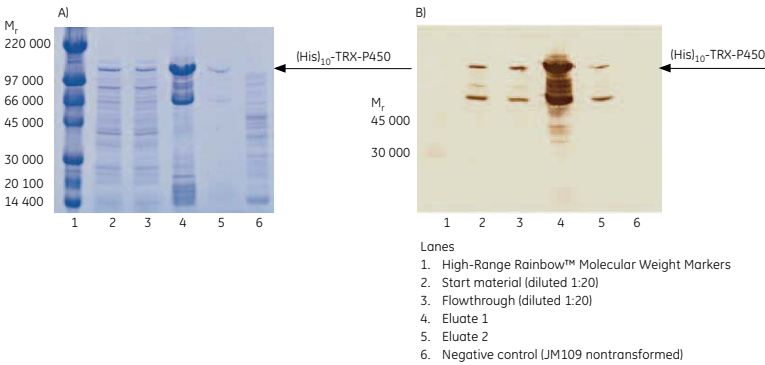


图36: 对用His GraviTrap柱纯化(His)₁₀-TRX-P450的 (A) SDS-PAGE和 (B) 免疫蛋白印迹分析结果。

用HisPrep FF16/10进行规模化纯化

HisPrep FF16/10是特别设计的20ml HiPrep柱子，可以方便地简单、单步制备纯化组氨酸标签重组蛋白。柱子预装了Ni Sepahrose 6 Fast Flow柱材，具有高载量和优异的性能。对于简单的进一步规模化放大，可以将柱子串联使用（柱压可能增加）。



图37：HisPrep FF16/10可进行方便的规模化纯化组氨酸标签重组蛋白。

柱子由聚丙烯材料制成，具有生物兼容性并且不与生物分子发生相互作用。纯化可以简单地用ÄKTA design或其它层析系统进行。每个包装中都提供有接头以方便进行连接。层析系统的选择指南请参照表8，HisPrep FF16/10柱子的参数请参照附件1。HisPrep FF16/10不能打开或重装。

样品制备

通用的样品制备过程请参照26页。

- 通过加入缓冲液、氯化钠、咪唑和添加剂的浓储液，用结合缓冲液稀释样品，或者通过交换缓冲液等手段来使样品适应结合缓冲液的组成和pH值。在样品和结合缓冲液中添加低浓度的咪唑对于防止有组氨酸暴露在外的宿主细胞蛋白结合在柱上是必要的（见第4章）。
- 在使用样品前一刻，将样品用0.22或0.45 μ m的滤膜过滤，并且（或者）离心。如果样品过于粘稠，为了防止堵塞柱子，需用结合缓冲液稀释样品、增加裂解操作（离心、匀浆）或加入DNase/RNase来降低核酸片断的大小。

准备缓冲液

结合缓冲液：20mM 磷酸钠，500mM 氯化钠，20-40mM 咪唑，pH7.4（最优的咪唑浓度是蛋白依赖的，20-40mM 适合于大多数蛋白）

洗脱缓冲液：20mM 磷酸钠，500mM 氯化钠，500mM 咪唑 pH7.4

- 对于不同的蛋白，需要在样品和缓冲液中添加咪唑（以获得最好的纯度和产量）的浓度也会不同。在结合缓冲液中，20-40mM咪唑适合于大多数蛋白。洗脱缓冲液中的500mM咪唑能够保证目的蛋白的完全洗脱。
- 作为用咪唑洗脱的替换选择，可以降低pH值至4.5（金属离子在pH低于4.0时会从介质中被剥离下来）。

纯化

对于第一次使用，需要为系统设定合适的限压并用100ml结合缓冲液平衡柱子。

1. 将在结合缓冲液中离心或过滤过的样品上样到柱子上，使用1-10 ml/min的流速（30-300cm/h）。
2. 用5到10个柱体积的结合缓冲液洗涤柱子，使用2-10 ml/min的流速（60-300 cm/h）。
3. 用5到10个柱体积的洗脱缓冲液洗脱结合的蛋白，使用2-10 ml/min的流速（60-300 cm/h）。
4. 洗脱结束后，通过用大概100ml结合缓冲液洗涤柱子以再生。随后柱子即可进行下一步纯化。

如果纯化同一蛋白，柱子不需要进行金属离子的剥离和重新装载的过程。重复使用任何的柱子都取决于样品的性质，同一柱子应该用来纯化相同的蛋白以避免交叉污染。关于本话题以及柱子清洗和储存的更多信息请参见附录1。

Ni Sepharose与还原剂兼容。然而，我们建议在加入含有还原剂的缓冲液/样品之前，除去任何弱结合的Ni²⁺离子。这可以通过用不含还原剂的一个空白运行来实现（见下文）。不要把HisPrep用含有还原剂的缓冲液保存。

在所有正常的情况下，从Ni Sepharose 上泄漏的Ni²⁺离子很少。该介质的泄漏比其他检测的预装载的IMAC介质都要低。

对于非常苛刻的应用，纯化过程中Ni的泄漏可以通过在上样前进行空白运行（见下文）而进一步降低。

空白运行

使用不含还原剂的结合缓冲液和洗脱缓冲液。

1. 用5个柱体积的蒸馏水洗涤柱子以除去20%乙醇。
2. 用5个柱体积的洗脱缓冲液洗涤。
3. 用10个柱体积的结合缓冲液平衡柱子。

应用案例

参见第50页的应用案例3。

使用未装载金属离子的介质进行纯化

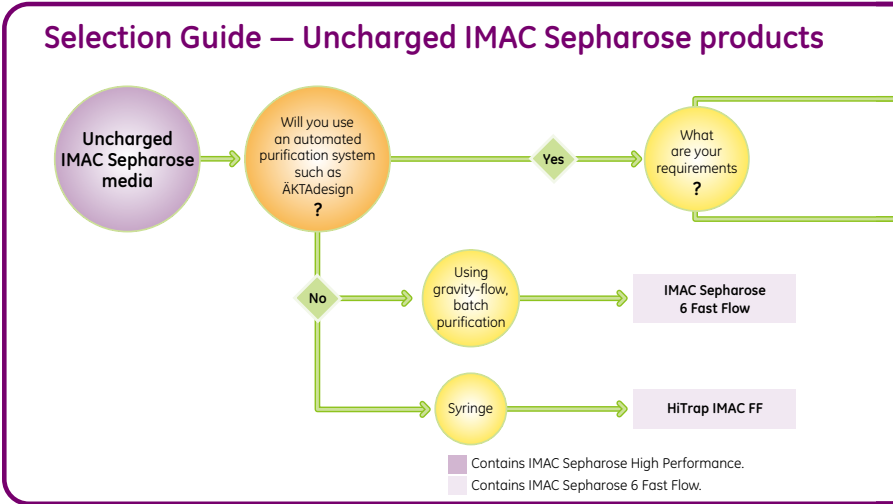
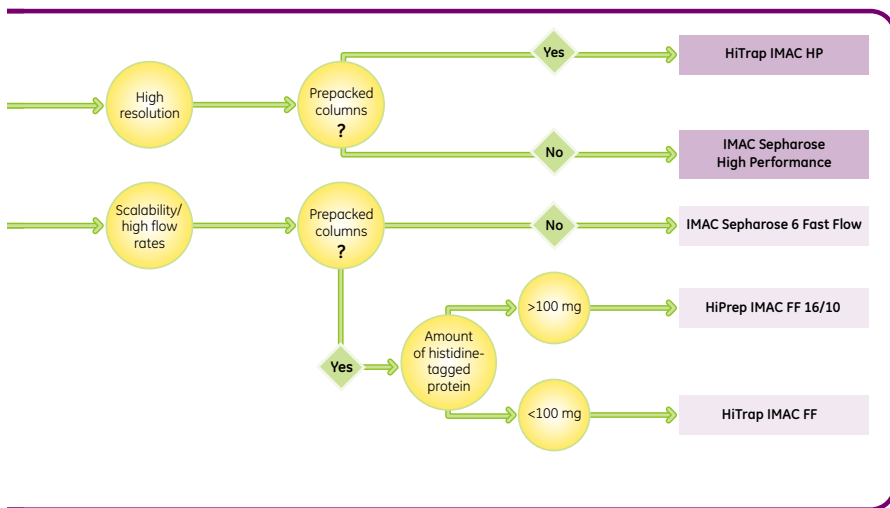


图38：未装载金属离子介质的选择指南。

图38提供了未装载金属离子的IMAC Sepharose产品选择指南。表11详细介绍了这些选择。总的来说，当高分辨和高载量比较重要时，推荐使用IMAC Sepharose High Performance，当需要规模化放大时，推荐使用IMAC Sepharose 6 Fast Flow。

表11：用未装载金属离子的IMAC Sepharose产品纯化组氨酸标签重组蛋白的选项。

产品	形式或柱子大小	大概的结合能力	描述	高通量筛选	小量制备	批量/重力流	注射器	ÄKTA design 系统
IMAC Sepharose High Performance	25ml 100ml	40mg/ml (Ni2+)	用于高分辨、洗脱更浓的样品（高效纯化）	+	(+)	-	-	+
HiTrap IMAC HP	1ml	每根柱子40mg (Ni2+)	主要用于蠕动泵和层析系统。用于高分	-	-	-	(+)	+
	5ml	每根柱子200mg (Ni2+)	辨、洗脱更浓的样品（高效纯化）					
IMAC Sepharose 6 Fast Flow	25ml 100ml	40mg/ml (Ni2+)	由于高载量和高流速，非常适合规模化放大	+	+	+	-	+



产品	形式或 柱子大小	大概的结 合能力	描述	高通 量筛 选	小量 制备	批量/重 力流	注射器	ÄKTA design 系统
HiPreP	20ml	每根柱	使用层析系	-	-	-	-	+
IMAC FF	1ml	子800mg	统。规模化纯	-	-	-	+	+
16/10	5ml	(Ni ²⁺)	化。					
HiTrap		每根柱	可以用注射					
IMAC FF		子40mg	器，蠕动泵和					
		(Ni ²⁺)	层析系统。提					
		每根柱	供优良的流动					
		子200mg	性能。					
		(Ni ²⁺)	放大纯化。					

包含IMAC Sepharose High Performance

包含IMAC Sepharose 6 Fast Flow

用IMAC Sepharsoe High Performance进行纯化

IMAC Sepharsoe High Performance是一种未装载金属离子的介质，它由高度交联的34 μ m6%的琼脂糖珠组成，螯合基团通过化学键固定在上面。螯合基团可以由使用者装载上合适的金属离子，使介质能够有选择性地结合目的蛋白。小直径的介质珠有较高的层析分辨率，可以获得含有浓缩蛋白的分离峰。该介质与一系列添加剂高度兼容，非常适合能够产生浓缩蛋白的高效纯化。IMAC Sepharsoe High Performance的性质请参照附录1。IMAC Sepharsoe High Performance以预浸胀好的形式保存在20%的乙醇中。



图39: IMAC Sepharsoe High Performance以没有装载金属离子的形式提供，使它能够用于纯化组氨酸标签重组蛋白或天然蛋白。它以25ml和100ml实验室自装及预装的1ml和5ml柱子的形式提供。

装柱

装柱的大体指南请参见附录4。

理想情况下，IMAC Sepharsoe High Performance柱材通过两步填装在XK或Tricon柱子中：在第一步不要超过1.0bar（0.1MPa），在第二步不要超过3.5bar（0.35MPa）。如果填装仪器不包括压力指示器，在第一步用5ml/min的流速（XK16/20）或2ml/min的流速（Tricon 10/100柱子），在第二步用9ml/min（XK16/20）或3.6ml/min（Tricon 10/100柱子）的流速。如果不能达到建议的流速，使用泵所能及的最大流速，这也会提供一个填装完好的柱床。

1. 组装柱子（需要时一同组装装柱池）
2. 用蒸馏水冲洗以除去末端以及适配器的气泡。确认在柱床支持处无气泡残留。关掉柱子流出口，保持柱床支持处被水覆盖。
3. 重悬介质，单次连续地把柱材悬浊液铺在柱管中。用靠在柱管上的玻璃棒引流会尽量减少

气泡的引入。

4. 如果使用装柱池，迅速将柱子其它空白处和装柱池充满水，把适配器或装柱池的盖子装上，然后将柱子连接到泵上，避免在适配器或入水管中残存气泡。
5. 打开柱子底部出口，将泵设置为所需流速。
6. 保持装柱流速至少3个柱体积，直到达到一个稳定不变的柱床高度。在柱上标记柱床高度。
7. 关闭泵，关闭柱子出口。
8. 如果使用装柱池，解开装柱池，并把适配器装到柱子上。
9. 解开适配器入口，将适配器推进柱子，直到达到标记处。用装柱溶液冲洗适配器入口，锁定适配器位置。
10. 把柱子连接到泵或者层析系统上，并开始平衡。如果需要，重新调整适配器。
注：在随后的层析过程中，流速不要超过装柱流速的75%。

样品制备

通用的样品制备过程请参照26页。

-  通过加入缓冲液、氯化钠、咪唑和添加剂的浓储液，用结合缓冲液稀释样品，或者通过交换缓冲液等手段来使样品适合结合缓冲液的组成和pH值。在样品和结合缓冲液中添加低浓度的咪唑对于防止有组氨酸暴露在外的宿主细胞蛋白结合在柱上是必要的（见第4章）。
-  在使用样品前一刻，将样品用0.22或0.45 μ m的滤膜过滤，并且（或者）离心。如果样品过于粘稠，为了防止堵塞柱子，需用结合缓冲液稀释样品、增加裂解操作（离心、匀浆）或加入DNase/RNase来降低核酸片断的大小。

准备缓冲液

结合缓冲液：20mM 磷酸钠，0.5-1.0M 氯化钠，20-40mM 咪唑，pH7.4（最优的咪唑浓度是蛋白依赖的，20-40mM 适合于大多数蛋白）

洗脱缓冲液：20mM 磷酸钠，0.5M 氯化钠，500mM 咪唑 pH7.4

-  用于准备缓冲液的水和化学药品应该是高纯的。使用前用0.45 μ m的滤膜过滤。用高纯度的咪唑，这会在280nm处无紫外吸收或低吸收。
-  对于不同的蛋白，需要在样品和缓冲液中添加咪唑（以获得最好的纯度和产量）的浓度也会不同。在结合缓冲液中，20-40mM咪唑适合于大多数蛋白。洗脱缓冲液中的500mM咪唑能够保证目的蛋白的完全洗脱。

用金属离子装载介质

1. 在蒸馏水中准备0.1M所需金属离子的溶液（比如Cu²⁺，Zn²⁺，Co²⁺，Fe³⁺或Ni²⁺）。可以使用盐酸盐、硫酸盐等（比如0.1M硫酸铜或0.1M硫酸镍）。Zn²⁺离子溶液的pH值应大概在5.5或更低，用以避免在pH6或更高时有溶解性的问题。Fe³⁺离子应该在低pH值（pH3.0左右）下装载，以避免形成不溶的铁化合物。
2. 用至少两个柱体积的去离子水洗柱子。
3. 向柱子中加入至少0.2倍柱体积的金属离子溶液。
4. 用至少5倍体积的蒸馏水洗柱子，除去多余的金属离子。



在装载金属离子前用缓冲液洗涤柱子可能会造成沉淀。



如果纯化同一蛋白，柱子不需要进行金属离子的剥离和重新装载的过程。重复使用任何的柱子都取决于样品的性质，同一柱子应该用来纯化相同的蛋白以避免交叉污染。关于本话题以及柱子清洗和储存的更多信息请参见附录1。



IMAC Sepharsoe High Performance与还原剂兼容。然而，我们建议在加入含有还原剂的缓冲液/样品之前，除去任何弱结合的金属离子。这可以通过用不含还原剂的一个空白运行来实现（见下文）。不要把IMAC Sepharsoe High Performance用含有还原剂的缓冲液保存。



在所有正常的情况下，金属离子的泄漏很少。对于非常苛刻的应用，纯化过程中金属离子的泄漏可以通过在上样前进行空白运行（见下文）而进一步降低。

空白运行

使用不含还原剂的结合缓冲液和洗脱缓冲液。

1. 用5个柱体积的蒸馏水洗柱子以除去20%乙醇。
2. 用5个柱体积的洗脱缓冲液洗涤。
3. 用10个柱体积的结合缓冲液平衡柱子。

纯化

7. 如果柱子里含有20%的乙醇，用蒸馏水洗5个柱体积，线性流速为50-100cm/h。流速的计算请参见附录6。
8. 以150cm/h的线性流速用结合缓冲液平衡柱子5到10个柱体积。
9. 加入预处理过的样品。
10. 用结合缓冲液洗涤，直到吸收达到基线。
11. 用洗脱缓冲液洗脱，可以采用逐步洗脱或线性梯度洗脱。如果采用逐步洗脱，5个柱体积通常就足够了。如果采用线性梯度洗脱，一个20个柱体积的缓梯度可能会分离有近似结合能力的蛋白。
12. 洗脱后，用5-10个柱体积的结合缓冲液再生柱子。此时柱子即可用于下一次纯化。



如果手动测量吸收，请用洗过缓冲液作为参比。如需要把咪唑从蛋白中除去，请使用 Hitrap Desalting、PD-10 Desalting 或 HiPrep 26/10 Desalting 脱盐柱。

用IMAC Sepharsoe 6 Fast Flow进行纯化

IMAC Sepharsoe 6 Fast Flow由90 μ m高度交联的琼脂糖珠组成。螯合基团通过化学键固定在上面。螯合基团可以由使用者装载上合适的金属离子，使介质能够有选择性的结合目的蛋白。IMAC Sepharsoe 6 Fast Flow介质显示了高蛋白结合能力。结合能力是蛋白依赖的而且是金属离子依赖的。介质容易填装和使用，高流速的性质使它适合于规模化放大。IMAC Sepharsoe 6 Fast Flow的主要性质参照附录1。IMAC Sepharsoe 6 Fast Flow以20%乙醇预浸胀好的形式提供。



图40：IMAC Sepharsoe 6 Fast Flow的高流速特性使得它方便进行纯化组氨酸标签重组蛋白或天然蛋白。它为实验室规模和生产规模使用提供很多选择。

装柱

装柱的大体指南请参见附录4。



理想情况下，IMAC Sepharsoe 6 Fast Flow柱材通过两步填装在XK或Tricon柱子中：在第一步不要超过0.5bar（0.05MPa），在第二步不要超1.5bar（0.15MPa）。如果填装仪器不包括压力指示器，在第一步用2.5ml/min的流速（XK16/20）或0.9ml/min的流速（Tricon 10/100柱子），在第二步用8.7ml/min（XK16/20）或4.7ml/min（Tricon 10/100柱子）的流速。

1. 组装柱子（需要时一同组装装柱池）
2. 用蒸馏水冲洗以除去末端以及适配器的气泡。确认在柱床支持处无气泡残留。关掉柱子流出口，保持柱床支持处被水覆盖。
3. 重悬介质，单次连续地把柱材悬液液铺在柱管中。用靠在柱管上的玻璃棒引流会尽量减少

气泡的引入。

4. 如果使用装柱池，迅速将柱子其它空白处和装柱池充满水，把适配器或装柱池的盖子装上，然后将柱子连接到泵上，避免在适配器或入水管中残存气泡。
5. 打开柱子底部出口，将泵设置为所需流速。
6. 保持装柱流速至少3个柱体积，直到达到一个稳定不变的柱床高度。在柱上标记柱床高度。
7. 关闭泵，关闭柱子出口。
8. 如果使用装柱池，解开装柱池，并把适配器装到柱子上。
9. 解开适配器入口，把适配器推进柱子，直到达到标记处。让装柱溶液冲洗适配器入口，锁定适配器位置。
10. 把柱子连接到泵或者层析系统上，并开始平衡。如果需要，重新调整适配器。

注：在随后的层析过程中，流速不要超过装柱流速的75%。

样品制备

通用的样品制备过程请参照26页。

- 通过加入缓冲液、氯化钠、咪唑和添加剂的浓储液，用结合缓冲液稀释样品，或者通过交换缓冲液等手段来使样品适应结合缓冲液的组成和pH值。在样品和结合缓冲液中添加低浓度的咪唑对于防止有组氨酸暴露在外的宿主细胞蛋白结合在柱上是必要的（见第4章）。
- 在使用样品前一刻，将样品用0.22或0.45 μ m的滤膜过滤，并且（或者）离心。如果样品过于粘稠，为了防止堵塞柱子，需用结合缓冲液稀释样品、增加裂解操作（离心、匀浆）或加入DNase/RNase来降低核酸片断的大小。

准备缓冲液

结合缓冲液：20mM 磷酸钠，0.5-1.0M 氯化钠，20-40mM 咪唑，pH7.4（最优的咪唑浓度是蛋白依赖的，20-40mM 适合于大多数蛋白）

洗脱缓冲液：20mM 磷酸钠，0.5M 氯化钠，500mM 咪唑，pH7.4

- 用于准备缓冲液的水和化学药品应该是高纯的。使用前用0.22或0.45 μ m的滤膜过滤。用高纯度的咪唑，这会在280nm处无紫外吸收或低吸收。
 - 对于不同的蛋白，需要在样品和缓冲液中添加咪唑（以获得最好的纯度和产量）的浓度也会不同。在结合缓冲液中，20-40mM咪唑适合于大多数蛋白。洗脱缓冲液中的500mM咪唑能够保证目的蛋白的完全洗脱。
- 用金属离子装载介质

1. 在蒸馏水中准备0.1M所需金属离子的溶液（比如Cu²⁺，Zn²⁺，Co²⁺，Fe³⁺或Ni²⁺）。可以使用盐酸盐、硫酸盐等（比如0.1M硫酸铜或0.1M硫酸镍）。

 Zn²⁺离子溶液的pH值应该大概在5.5或更低，用以避免在pH6或更高时有溶解性的问题。
Fe³⁺离子应该在低pH（pH3.0左右）下装载，以避免形成不溶的铁化合物。

2. 用至少两个柱体积的去离子水洗柱子。
3. 向柱子中加入至少0.2倍柱体积的金属离子溶液。
4. 用至少5倍体积的蒸馏水洗柱子，除去多余的金属离子。



在装载金属离子前用缓冲液洗涤柱子可能会造成沉淀。

 如果纯化同一蛋白，柱子不需要进行金属离子的剥离和重新装载的过程。重复使用任何的柱子都取决于样品的性质，同一柱子应该用来纯化相同的蛋白以避免交叉污染。关于本话题以及柱子清洗和储存的更多信息请参见附录1。

 IMAC Sepharsoe 6 Fast Flow与还原剂兼容。然而，我们建议在加入含有还原剂的缓冲液/样品之前，除去任何弱结合的金属离子。这可以通过用不含还原剂的一个空白运行来实现（见下文）。不要把IMAC Sepharsoe 6 Fast Flow用含有还原剂的缓冲液保存。

 在所有正常的情况下，金属离子的泄漏很少。对于非常苛刻的应用，纯化过程中金属离子的泄漏可以通过在上样前进行空白运行（见下文）而进一步降低。

空白运行

使用不含还原剂的结合缓冲液和洗脱缓冲液。

1. 用5个柱体积的蒸馏水洗柱子以除去20%乙醇。
2. 用5个柱体积的洗脱缓冲液洗涤。
3. 用10个柱体积的结合缓冲液平衡柱子。

纯化

13. 如果柱子里含有20%的乙醇，用蒸馏水洗5个柱体积，线性流速为50-100cm/h。流速的计算请参见附录6。
14. 以150cm/h的线性流速用结合缓冲液平衡柱子5到10个柱体积。
15. 加入预处理过的样品。
16. 用结合缓冲液洗涤，直到吸收达到基线。
17. 用洗脱缓冲液洗脱，可以采用逐步洗脱或线性梯度洗脱。如果采用逐步洗脱，5个柱体积通常就足够了。如果采用线性梯度洗脱，一个20个柱体积的缓梯度可能会分离有近似结合能力的蛋白。
18. 1洗脱后，用5-10个柱体积的结合缓冲液再生柱子。此时柱子即可用于下一次纯化。

 如果手动测量吸收，请用洗过缓冲液作为参比。如需要把咪唑从蛋白中除去，请使用 Hitrap Desalting、PD-10 Desalting 或 HiPrep 26/10 Desalting 脱盐柱。

用HiTrap IMAC HP和HiTrap IMAC FF柱进行纯化

HiTrap IMAC HP和HiTrap IMAC FF分别预装了1ml和5ml IMAC Sepharsoe High Performance和IMAC Sepharsoe 6 Fast Flow。样品上样、洗涤、洗脱可以用带有适配器的注射器、蠕动泵或如ÅTKAdesign的液相层析系统来完成（仪器的选择见表8）。

HiTrap IMAC HP和HiTrap IMAC FF的柱管由聚丙烯制成，具有生物兼容性并且不与生物分子发生相互作用。顶端和底端由多孔的聚乙烯烧结而成。柱子在运输时入口被塞子堵住，而出口是被封死的，但可以掰断。每个包装都含有所有用于把柱子连接到不同仪器上的必需配件。为快速放大纯化规模，两个或者三个HiTrap 柱子（1ml或5ml）可以串联使用（柱压会高些）。注意，HiTrap IMAC柱不能打开或者再次填装。



图41: HiTrap IMAC 1ml柱分别装载了Cu²⁺, Zn²⁺, Co²⁺和Ni²⁺。

样品制备

通用的样品制备过程请参照26页。

- 通过加入缓冲液、氯化钠、咪唑和添加剂的浓储液，用结合缓冲液稀释样品，或者通过交换缓冲液等手段来使样品适应结合缓冲液的组成和pH值。在样品和结合缓冲液中添加低浓度的咪唑对于防止有组氨酸暴露在外的宿主细胞蛋白结合在柱上是必要的（见第4章）。
- 在使用样品前一刻，将样品用0.22或0.45μm的滤膜过滤，并且（或者）离心。如果样品过于粘稠，为了防止堵塞柱子，需用结合缓冲液稀释样品、增加裂解操作（离心、匀浆）或加入DNase/RNase来降低核酸片断的大小。

准备缓冲液

结合缓冲液：20mM 磷酸钠，500mM 氯化钠，20-40mM 咪唑，pH7.4（最优的咪唑浓度是蛋白依赖的，20-40mM 适合于大多数蛋白）

洗脱缓冲液：20mM 磷酸钠，500mM 氯化钠，500mM 咪唑，pH7.4

- 用于准备缓冲液的水和化学药品应该是高纯的。使用前用0.22或0.45μm的滤膜过滤。使用高纯度的咪唑，这会在280nm处无紫外吸收或低吸收。

 对于不同的蛋白，需要在样品和缓冲液中添加咪唑（以获得最好的纯度和产量）的浓度也会不同。在结合缓冲液中，20-40mM咪唑适合于大多数蛋白。洗脱缓冲液中的500mM咪唑能够保证目的蛋白被完全洗脱。

用金属离子装载介质

1. 在蒸馏水中准备0.1M所需金属离子的溶液（比如Cu²⁺，Zn²⁺，Co²⁺，Fe³⁺或Ni²⁺）。可以使用盐酸盐、硫酸盐等（比如0.1M硫酸铜或0.1M硫酸镍）。
-  Zn²⁺离子溶液的pH应该大概在5.5或更低，用以避免在pH6或更高时有溶解性的问题。Fe³⁺离子应该在低pH（pH3.0左右）下装载，以避免形成不溶的铁化合物。
2. 将注射器或泵管用蒸馏水装满。移除塞子，把柱子连接到注射器（用提供的接头）、蠕动泵或层析系统上。保持连接处一直有液体避免向系统中引入气泡。
3. 除掉柱子底部的密封。
4. 用去离子水洗掉乙醇。HiTrap IMAC HP和HiTrap IMAC FF 1ml柱用5ml水，HiTrap IMAC HP和HiTrap IMAC FF 5ml柱用15ml水。在此阶段，不要用缓冲液洗涤柱子，否则可能会导致金属离子在第5步沉淀。
5. 将水洗过的柱子用0.1M金属离子盐溶液装载。HiTrap IMAC HP和HiTrap IMAC FF 1ml柱至少用0.5ml，HiTrap IMAC HP和HiTrap IMAC FF 5ml柱至少用2.5ml。
6. 重复第4步中的水洗过程。
7. 用至少5个柱体积的结合缓冲液平衡柱子。建议流速为1ml/min（1ml柱子）和5 ml/min（5ml柱子）。



在装载金属离子前用缓冲液洗涤柱子可能会造成沉淀。

 如果纯化同一蛋白，柱子不需要进行金属离子的剥离和重新装载的过程。重复使用任何的柱子都取决于样品的性质，同一柱子应该用来纯化相同的蛋白以避免交叉污染。关于本话题以及柱子清洗和储存的更多信息请参见附录1。

 IMAC Sepharsoe与还原剂兼容。然而，我们建议在加入含有还原剂的缓冲液/样品之前，除去任何弱结合的金属离子。这可以通过用不含还原剂的一个空白运行来实现（见下文）。不要把HiTrap IMAC柱用含有还原剂的缓冲液保存。

 金属离子的泄漏很少。对于非常苛刻的应用，纯化过程中金属离子的泄漏可以通过在上样前进行空白运行（见下文）而进一步降低。

空白运行

使用不含还原剂的结合缓冲液和洗脱缓冲液。

4. 用5个柱体积的蒸馏水洗涤柱子以除去20%乙醇。
5. 用5个柱体积的洗脱缓冲液洗涤。
6. 用10个柱体积的结合缓冲液平衡柱子。

纯化

1. 用注射器或者蠕动泵加入预处理的样品，为了获得最好的结果，在上样时，用0.2-1ml/min（1ml柱子）和0.5-5ml/min（5ml柱子）的流速。
2. 用结合缓冲液洗涤至少10到15个柱体积，直到吸收达到平稳的基线或在流出物中没有物质流出。
3. 用洗脱缓冲液采用一步洗脱或者线性梯度洗脱。对于分步洗脱，5个柱体积通常来说足够了。对于线性梯度洗脱，10到20个柱体积可以分离开具有相似结合能力的蛋白。
4. 洗脱后，用5到10倍柱体积的结合缓冲液洗涤以再生柱子。此时柱子可用来进行下一次纯化。

当使用注射器时，1ml/min对应于大概每分钟30滴（HiTrap 1ml柱子），5ml/min对应于大概每分钟120滴（HiTrap 5ml柱子）。

-  如果纯化同一蛋白，柱子不需要进行金属离子的剥离和重新装载的过程。重复使用任何的柱子都取决于样品的性质，同一柱子应该用来纯化相同的蛋白以避免交叉污染。关于本话题以及柱子清洗和储存的更多信息请参见附录1。

应用案例

用不同的金属离子筛选优化蛋白纯度

YNR064C（分子量33700）是毕氏酵母表达的六组氨酸标签蛋白。本案例中分别用装载了Cu²⁺，Zn²⁺，Co²⁺或Ni²⁺离子的HiTrap IMAC 1ml柱子在相同条件下进行分离。层析结果和对收集组分的SDS-PAGE分析见图42A到E。

结果显示，对于这种六组氨酸标签蛋白，用Ni²⁺和Cu²⁺可以获得最高纯度。虽然Cu²⁺离子在所用条件下，目的蛋白有少量损失（图42E，第4道）。

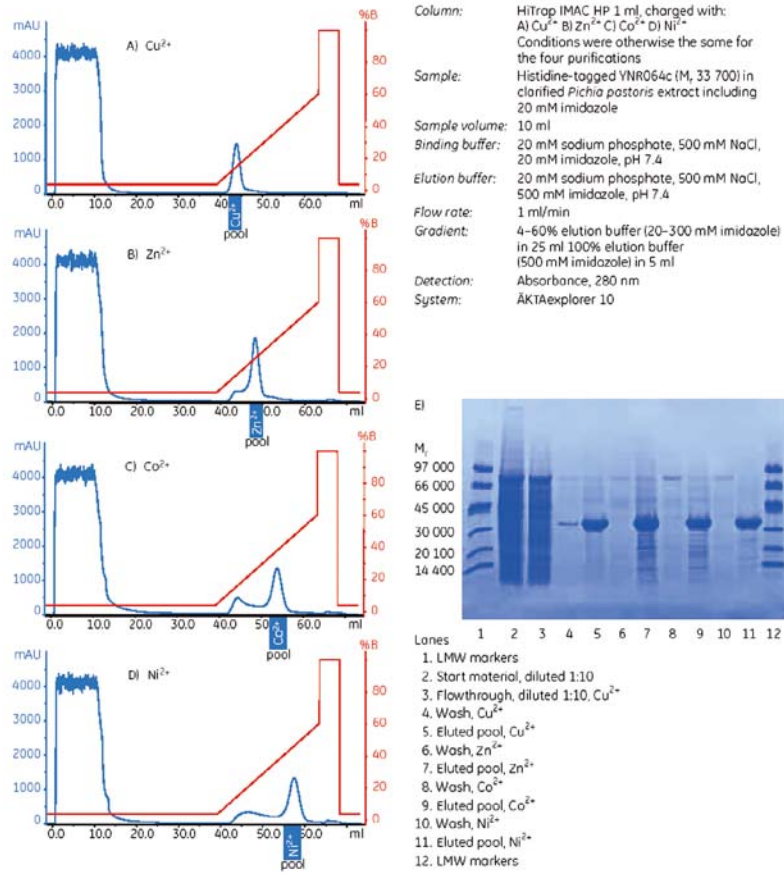


图42：（分子量33 700）是毕氏酵母表达的蛋白。 分别用装载了（A）Cu²⁺，（B）Zn²⁺，（C）Co²⁺或（D）Ni²⁺离子的HiTrap IMAC 1ml柱子在相同的条件进行分离毕氏酵母中表达的六组氨酸标签的YNR064C。对每个1ml组分进行电泳后，选择收集的组分被标识出来。还原条件下

用HiPrep IMAC FF 16/10柱进行制备纯化

HiPrep IMAC FF 16/10是可以立即使用的预装了IMAC Sepharsoe 6 Fast Flow的20ml柱子。该柱子非常适合制备纯化组氨酸标签蛋白及无标签天然蛋白。HiPrep IMAC FF 16/10以一种方便的形式提供了快速、简单的分离形式，而IMAC Sepharsoe 6 Fast Flow柱材非常适合规模化放大。

柱管由聚丙烯制成，具有生物兼容性并且不与生物分子发生相互作用。分离可以简单的用诸如ÄKTAdesign的层析系统完成。纯化仪器的选择指南请参照表8，HiPrep IMAC FF 16/10柱子的参数参照附录1。

HiPrep IMAC Fast Flow也以预装1ml和5ml HiTrap IMAC柱以及用于实验室自装的25ml和100ml柱材的形式提供。

样品制备

通用的样品制备过程请参照26页。

-  通过加入缓冲液、氯化钠、咪唑和添加剂的浓储液，用结合缓冲液稀释样品，或者通过交换缓冲液等手段来使样品适合结合缓冲液的组成和pH值。在样品和结合缓冲液中添加低浓度的咪唑对于防止有组氨酸暴露在外的宿主细胞蛋白结合在柱上是必要的（见第4章）。
-  在使用样品前一刻，将样品用0.22或0.45μm的滤膜过滤，并且（或者）离心。如果样品过于粘稠，为了防止堵塞柱子，需用结合缓冲液稀释样品、增加裂解操作（离心、匀浆）或加入DNase/RNase来降低核酸片断的大小。

准备缓冲液

结合缓冲液：20mM 磷酸钠，500mM 氯化钠，20-40mM 咪唑，pH7.4（最优的咪唑浓度是蛋白依赖的，20-40mM 适合于大多数蛋白）

洗脱缓冲液：20mM 磷酸钠，500mM 氯化钠，500mM 咪唑，pH7.4

-  对于不同的蛋白，需要在样品和缓冲液中添加咪唑（以获得最好的纯度和产量）的浓度也会不同。在结合缓冲液中，20-40mM咪唑适合于大多数蛋白。洗脱缓冲液中的500mM咪唑能够保证目的蛋白的完全洗脱。
-  用于准备缓冲液的水和化学药品应该是高纯的。使用前用0.22或0.45μm的滤膜过滤。使用高纯度的咪唑，这会在280nm处无紫外吸收或低吸收。

用金属离子装载介质

1. 在蒸馏水中准备0.1M所需金属离子的溶液（比如Cu²⁺，Zn²⁺，Co²⁺，Fe³⁺或Ni²⁺）。可以使用盐酸盐、硫酸盐等（比如0.1M硫酸铜或0.1M硫酸镍）。

 Zn²⁺离子溶液的pH值应该大概在5.5或更低，用以避免在pH6或更高时有溶解性的问题。Fe³⁺离子应该在低pH（pH3.0左右）下装载，以避免形成不溶的铁化合物。

2. 用至少两个柱体积的蒸馏水洗涤柱子。
3. 向柱子加入至少0.2倍柱体积的金属离子溶液。
4. 用至少5个柱体积的蒸馏水洗涤柱子以除去过量的金属离子。

 在装载金属离子前用缓冲液洗涤柱子可能会造成沉淀。

纯化

1. 将在结合缓冲液中的离心或过滤过的样品上样到柱子中，流速是1-10ml/min（30-300cm/h）。
2. 用结合缓冲液洗涤5到10个柱体积，流速为2-10 ml/min（60-300 cm/h）。
3. 用5到10个柱体积的洗脱缓冲液洗脱结合的蛋白，流速为2-10 ml/min（60-300 cm/h）。
4. 洗脱后，用5到10倍柱体积的结合缓冲液洗涤柱子以再生。此时柱子即可用来进行下一次纯化。

 如果纯化同一蛋白，柱子不需要进行金属离子的剥离和重新装载的过程。重复使用任何的柱子都取决于样品的性质，同一柱子应该用来纯化相同的蛋白以避免交叉污染。关于本话题以及柱子清洗和储存的更多信息请参见附录1。

 IMAC Sepharose与还原剂兼容。然而，我们建议在加入含有还原剂的缓冲液/样品之前，除去任何弱结合的金属离子。这可以通过用不含还原剂的一个空白运行来实现（见下文）。不要把HiPrep IMAC FF16/10柱用含有还原剂的缓冲液保存。

 金属离子的泄漏很少。对于非常苛刻的应用，纯化过程中金属离子的泄漏可以通过在上样前进行空白运行（见下文）而进一步降低。

空白运行

使用不含还原剂的结合缓冲液和洗脱缓冲液。

1. 用5个柱体积的蒸馏水洗涤柱子以除去20%乙醇。
2. 用5个柱体积的洗脱缓冲液洗涤。
3. 用10个柱体积的结合缓冲液平衡柱子。

应用案例

优化并规模化纯化无标签蛋白

IMAC技术也可以用来纯化无组氨酸标签的蛋白。下面这个例子就代表了这种应用。该实验是纯化重组的牛碳酸酐酶II（rBCA，分子量30000），该蛋白天然具有暴露在外的组氨酸残基。该实验用来优化纯化方法以及对规模化放大过程中结合步骤的效率进行评估。

三种金属离子（Cu²⁺，Ni²⁺和Zn²⁺）以及两种洗脱方法（咪唑和pH值）被用来试验以建立在处

理规模上纯化r-BCA的实验方案。HiTrap IMAC FF 1ml柱用来建立条件。三种金属离子都获得了高的纯度；结合能力的顺序为 $Zn^{2+}=Ni^{2+}>Cu^{2+}$ （数据未显示）。 Zn^{2+} 离子因为低毒性，应该优先考虑作为处理规模纯化所用，因此它是规模化实验的合适选择。结果也显示两种洗脱方法都具有良好的收率和纯度（数据未显示）。由于低pH值洗脱较为便宜，它被选择用于规模化实验。在规模化研究中，用HiTrap IMAC FF 5ml柱和HiPrep IMAC FF 16/10 20ml柱获得的产率都很好（大于90%）（图43）。样品上样量是最大结合能力的75%。在不同的规模上，产率和纯度没有显著的差异（表12）。酶活力的得率用酯酶的活力检测，在两种规模上都大概是90%。金属离子泄漏，这一在工业生产上必须考虑的因素在本研究中也进行了调查。 Zn^{2+} 离子泄漏的总量非常低，对于HiPrep IMAC FF 16/10规模来说低于3%。需要注意的是rBCA需要在活性位点上有一个 Zn^{2+} 离子才能有酶活力。纯化后简单的脱盐步骤（HiPrep 26/10 Desalting）除去了所有的金属离子（除了在蛋白活性位点的离子）。

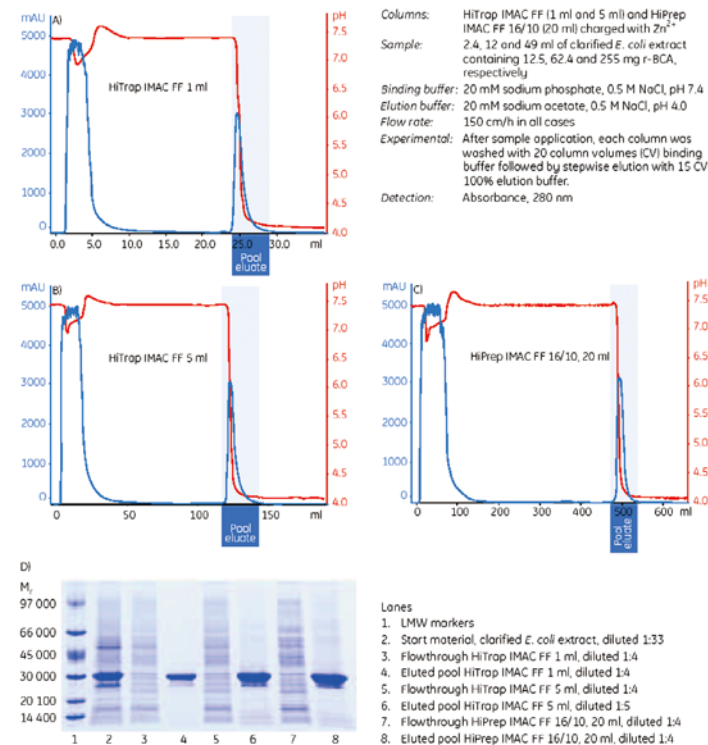


图43：层析显示从（A）HiTrap IMAC 1ml柱到（B）HiTrap IMAC 5ml柱和（C）HiPrep IMAC FF 16/10 20ml柱的规模化放大纯化。样品分别为2.4ml、12ml和49ml净化大肠杆菌裂解物，其中含有12.5、62.4和255mg r-BCA蛋白。上样量大约是最大结合能力的74%。（D）对规模化放大实验中主要组分的非还原SDS-PAGE电泳分析（ExcelGel Gradient 8-18）。胶用1%的PhastGel Blue R（考马斯亮蓝）染色。

表12：用IMAC Sepharsoe 6 Fast Flow规模化放大纯化r-BCA的数据和结果。在不同运行之间的r-BCA的产量和回收率的比较显示出纯化方案的规模化。

柱子	组分	上样的蛋白 (mg)	洗脱的蛋白 (mg)	回收的蛋白 (mg)	回收的r-BCA 活力
HiTrap IMAC	净化的大肠杆菌裂解物	12.5	-	-	
FF 1ml	洗脱组分	-	11.7	94%	93%
HiTrap IMAC	净化的大肠杆菌裂解物	62.4	-	-	-
FF 5ml	洗脱组分	-	56.1	90%	84%
HiPrep IMAC	净化的大肠杆菌裂解物	255	-	-	-
FF16/10(20ml)	洗脱组分	-	235	92%	90%

组氨酸标签蛋白的检测

表13总结了可用于检测组氨酸标签蛋白的方法。这些方法可以根据实验条件进行选择。比如SDS-PAGE经常在表达纯化时用于监测其结果，但可能不适合作为通常大规模监测纯化筛选的样品。针对蛋白特异性的功能性检测很有用，但并不随时都有这种方法可用。

表13：用于检测组氨酸标签蛋白的方法。

通用的检测方法（检测标签）	评论
用抗His抗体进行ELISA分析	高特异性，只检测组氨酸标签蛋白。
用抗His抗体和ECL检测系统进行蛋白质免疫印迹分析	高特异性，只检测组氨酸标签蛋白。当使用优化浓度的HRP偶联的二抗时，有很少或没有背景。 ECL检测系统增强蛋白质免疫印迹的检测。 对于大多数重组表达应用来说，ECL提供足够高的灵敏度。 如果需要更高的灵敏度，可以使用ECL Advacne™。
针对目的蛋白特异的检测方法	
SDS-PAGE，并用考马斯亮蓝或银染	提供大小，纯度的信息。检测标签蛋白和杂质。
功能性分析	如果纯化的组氨酸标签蛋白具有活性，则可用于评估。 不是所有情况都能使用。 可能需要开发和优化。

SDS-PAGE分析

6×SDS上样缓冲液配方：0.35M Tris-HCl, 10.28% (W/V) 的SDS, 36% (V/V) 的甘油, 0.6M DTT（或5% β -巯基乙醇），0.012% (w/v) 溴酚蓝, pH6.8。分装成每份0.5ml，保存在-80oC。

1. 向5-10μl粗提取物上清、细胞裂解物、纯化组分中加入2μl 6× SDS上样缓冲液。
2. 漩涡震荡混合，90-100 oC加热5分钟。
3. 将样品上样到SDS-聚丙烯酰胺胶中。

4. 用合适的时间电泳跑胶，用考马斯亮蓝（Coomassie Blue R Tablets）或银（PlusOne Silver Staining Kit）染色。



所使用的SDS-PAGE胶的浓度应该根据目的蛋白的理论大小选择（见表14）。

表14：不同浓度的SDS-PAGE聚丙烯酰胺胶的分离范围。

在分离胶中的丙烯酰胺浓度（%）		分离大小范围（Mr×103）
单一浓度	5%	36-200
	7.5%	24-200
	10%	14-200
	12.5%	14-100
	15%	14-601
梯度浓度	5-15%	14-200
	5-20%	10-200
	10-20%	10-150

更大的蛋白在胶中迁移不显著。

Western blot分析

表达和纯化可以使用Western blot的分析方法进行监测。如果需要的话，可以用ECL、ECL plus或ECL Advance检测系统来提高灵敏度。

抗His抗体：

封闭/温育缓冲液：5%（w/v）脱脂奶粉、0.1%（v/v）Tween20溶于PBS（140mM 氯化钠，2.7mM 氯化钾，10mM 磷酸氢二钠，1.8 mM 磷酸二氢钾，pH7.3）中。

洗涤缓冲液：0.1%（v/v）Tween 20溶于PBS（同上）中。

用来检测抗His抗体的二抗（比如抗鼠的Ig、HRP偶联的Whole Ab，NA931）。

1. 用SDS-PAGE分离蛋白样品。



GE Healthcare提供的抗His抗体是一种单克隆抗体，避免了低水平的交叉反应抗体。然而，建议每次都含有组氨酸标签重组蛋白质粒的大肠杆菌超声后样品作为阴性对照。

2. 将电泳胶分离的蛋白转移到合适的膜上，比如Hybond ECL（作为后续的林检测）或Hybond P（为随后的ECL，ECL plus或ECL advance检测）。



电泳和转膜需要一系列仪器和试剂来完成。更详细的细节可以参照GE Healthcare的《蛋白电泳技术手册》和《Hybond ECL说明书》。

封闭膜

1. 将转有蛋白的膜放在如培养皿一样的容器中。
2. 加入50到200毫升封闭/温育缓冲液。
3. 在室温温和振动1-16小时。
4. 轻轻倒出并弃去缓冲液。



用封闭液长时间温育（至多16小时）能够降低背景信号。

用一抗温育膜

1. 准备好用封闭/温育缓冲液稀释的合适浓度的抗His抗体。比如将5-10 μ l抗体稀释到50ml缓冲液中。关于优化的更多信息请参照GE Healthcare Application Note 19-1139-13。
2. 将含有抗体的混合物倒入装有膜的容器中。
3. 在室温温和振动1小时。
4. 轻轻倒出并弃去含有抗体的缓冲液。
5. 用20-30ml封闭/温育缓冲液漂洗两次膜，洗掉大多数未结合的抗体。
6. 倒出并弃去洗涤液。
7. 在室温用20-30ml封闭/温育缓冲液，温和振动10-60分钟洗膜。
8. 弃去洗涤液并重复。

用二抗温育膜

1. 根据制造厂商的说明书，用封闭/温育缓冲液稀释抗鼠二抗。关于优化的更多信息请参照GE Healthcare Application Note 19-1139-13。
2. 将含有抗体的混合物倒入装有膜的容器。
3. 在室温温和振动1小时。
4. 轻轻倒出并弃去含有抗体的缓冲液。
5. 用20-30ml封闭/温育缓冲液重悬两次膜，洗掉大多数未结合的抗体。
6. 倒出并弃去含有洗涤液。
7. 在室温用20-30ml封闭/温育缓冲液，温和振动10到60分钟洗膜。
8. 弃去洗涤液并重复。
9. 用适合于偶联在二抗上的酶的底物进行曝光。

 关于优化抗体浓度进行Western blotting的更多信息请参照GE Healthcare Application Note 19-1139-13和产品宣传册14-0003-87。

 ECL, ECL plus和ECL Advance检测系统需要非常少的抗体就能获得很高的灵敏度。所以在这些实验方案中抗体的使用量（一抗和二抗）可以达到最少化。把实验方案的规模放小以及放在可封口的塑料袋中可以使用更少的抗体-缓冲液混合物。

 GE Healthcare的抗His抗体是一种单克隆抗体，经过试验证明，它在Western blot中不具有非特异背景。有些来源的抗His抗体可能会含有能和组氨酸标签重组蛋白样品中包含的各种大肠杆菌蛋白有交叉反应的抗体。这些抗体可以通过和大肠杆菌（不应含有编码组氨酸标签蛋白的质粒）超声后样品交叉吸附而除去。

用酶切的方法除去标签

在大多情况下，需要用完整的组氨酸标签蛋白进行功能性检测。如必须要移除标签，则可采取和移除GST标签类似的实验方案。引入特异的蛋白酶识别位点来进行后续的蛋白酶切。精确的酶切和纯化的实验方案依赖于原始的载体和用于酶切的特异性蛋白酶的性质。

 rTEV (Invitrogen) 带有6组氨酸标签，识别Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln ↓ Gly。蛋白酶会在Gln和Gly之间进行酶切，这一过程需要Glu、Tyr、Gln和Gly。N端的6组氨酸标签会被移除。用这种酶切的优点是目的蛋白可以用同样的Ni Sepahrose柱材或预装柱再次纯化。6组氨酸标签和6组氨酸标签的rTEV都会结合在柱子上，而目的蛋白可以在穿透中收集。

为了达到完全酶切所使用的蛋白酶量、温度、酶切时间都随特定的重组蛋白而变化。在初始实验中需确定最优的条件。

 在不同的时间点吸取样品，用SDS-PAGE分析产量、纯度和酶切的程度。进行SDS-PAGE分析所用的大概的分子量：

rTEV蛋白酶：29000，

Carboxypeptidas A蛋白酶（用于移除C端组氨酸标签）：94000。

 在组氨酸标签重组蛋白中没有PreScission蛋白酶识别位点。

 有些酶切方案需要第二次纯化步骤用来除去蛋白酶及其它杂质。需要使用常规的色谱分离技术，比如凝胶过滤层析（通常不需要进行优化）、离子交换或疏水作用层析（见附录9）。

应用案例

用ÄKTAexpress进行组氨酸标签的自动移除

下面我们展示用ÄKTAexpress进行组氨酸标签的自动移除的例子。所有在ÄKTAexpress上进行的多部纯化方案可以与自动的柱上酶切相组合。标签的酶切通常在亲和层析上于进一步纯化步骤之前进行。当酶切的蛋白被洗脱时，亲和柱被再生，亲和和标签、带有标签的蛋白酶、剩下的未被酶切的蛋白会在分别的出口被收集。实验方案包括有标签蛋白的结合、注入蛋白酶、温育、洗脱被酶切的蛋白，在毛细管中收集，接着进行后续纯化步骤。

四步方案：用AcTEV蛋白酶切六组氨酸标签重组蛋白

图44的例子显示纯化在大肠杆菌中表达的六组氨酸标签APC234（分子量32500）的纯化结果。酶切之后的蛋白分子量为30000。细胞收集后，通过超声裂解，样品在上样前用离心的方法净化。

亲和层析（AC）、脱盐（DS）、离子交换层析（IEX）、凝胶过滤层析（GF）都用图上标示的柱子在ÄKTAexpress上进行。每个样品的纯度用SDS-PAGE分析（考马斯亮蓝染色）。还原的样品上样到SDS聚丙烯酰胺胶上，每孔大概上样7.5µg蛋白。

Columns: AC: HiTrap HP, 5 ml
DS: HiPrep 26/30 Desalting
IEX: RESOURCETM Q, 6 ml
GF: HiLoad 16/60 Superdex 75 µg
Sample: APC234, M_r 32 000 cleaved product, M_r 30 000
Cleavage conditions: 200 units of AcTEVTM protease/mg protein, 8 h incubation time at room temperature
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

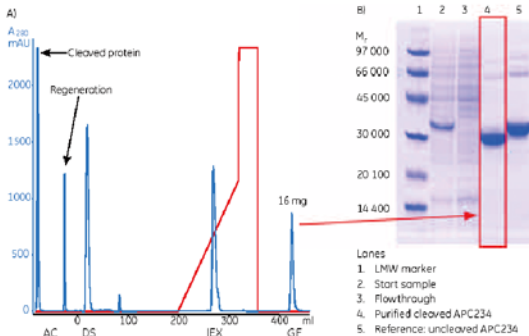


图44：（A）四步纯化6组氨酸标签的重组蛋白，并用AcTEV蛋白酶酶切。（B）酶切产物用SDS-PAGE分析，电泳胶用考马斯亮蓝染色。

问题解决

下面的问题解决指南着重指出在本章讨论中针对大部分产品都存在及针对某种特定方案存在的问题。对于后者，会注明相应的产品。

问题	可能原因	解决方法
柱子或玻璃壁堵住了，或离心的时候液体不能完全除去（His SpinTrap），流速太低（His GraviTrap）	有细胞碎片存在	离心或将样品用0.22或0.45μm的滤膜过滤。参照附录1进行介质清理。如果在外位清理不成功，更换柱材，重新填装柱子。在下次上样前优化样品预处理过程。尝试使用HisTrap FF Crude柱。
	样品由于含有物质太多或含有大分子量的核酸分子（柱压升高），而过于粘稠	- 增加裂解之前稀释细胞所用体积或在裂解之后稀释。 - 增加裂解时间，直到粘度下降。并/或增加DNase和Mg2+的剂量（DNaseI增加到5μg/ml，Mg2+增加到1mM）冰上温育10到15分钟。 - 增加机械裂解细胞的效率（比如增加超声功率）。保持样品在冰上以避免发泡或过热从而使目的蛋白变性。过度超声也可能导致宿主细胞蛋白和目的蛋白共纯化。 - 冻融未净化的样品可能会增加沉淀和聚集。对融化的样品进行超声能避免在上样时增加柱压。 - 如果纯化在4° C进行，可能的话移到室温进行。 - 将裂解物抽过注射器针头数次。 - 降低上样时的流速。

	蛋白在纯化过程中很难溶解或沉淀	- 首先，筛选适合蛋白可溶的条件：变化pH值、离子强度、蛋白浓度、去垢剂、其它能够影响蛋白可溶性的添加剂。如果这些方法仍不能使蛋白保持可溶，考虑用更剧烈的条件，比如8M尿素、6M盐酸胍或SDS（或其它强去垢剂）。向样品中加入去垢剂、还原剂或其它添加剂（2%TritonX-100，2%Tween 20，2%NP-40，2%cholate，1%CHAPS，1.5M 氯化钠，50%甘油，20mM β-巯基乙醇，1-3mM DTT或DTE（最多5mM，但是依赖于样品及样品体积），5mM TCEP，10mM还原型谷胱甘肽，8M尿素，或6M盐酸胍）温和混合30分钟来溶解目的蛋白。 - 注意TritonX-100和NP-40（Tween除外）在280nm处有强吸收，并且，去垢剂并不容易被缓冲液交换的方法除去。 - 包涵体蛋白通常可以溶解（并通过变性、复性来获得有活性的蛋白）于通常的变性剂中，比如4-6M盐酸胍，4-8M尿素或强去垢剂。温柔混合30分钟或更长时间用来溶解有标签蛋白，在有变性剂存在的条件下进行纯化。 - 如果可能的话降低洗脱缓冲液中氯化钠的浓度，调节样品的离子强度和pH值。
在纯化的组分中有很少或没有组氨酸标签重组蛋白	洗脱条件太温和（组氨酸标签重组蛋白仍然结合在柱上）	提高咪唑的浓度或降低pH值来确定最优的洗脱条件。
	蛋白沉淀在柱子或壁上	- 下次实验时，降低样品的量或通过咪唑的线性梯度而不是分步洗脱来降低蛋白浓度。 - 尝试使用去垢剂或改变氯化钠的浓度，或者在变性条件下（4-8M尿素或4-6M盐酸胍）洗脱。
	存在非特异的疏水作用或其它的相互作用	在洗脱缓冲液中加入非离子去垢剂（比如0.2% TritonX-100）或增加氯化钠的浓度。
组氨酸标签重组蛋白在穿透中	样品和结合缓冲液中的咪唑浓度不正确	降低咪唑浓度，原来的可能太高
	组氨酸标签可能没有充分暴露出来	在尿素或盐酸胍存在的条件下像纯化包涵体一样纯化去折叠蛋白。为了使样品的稀释最小，可以加入固体的尿素或盐酸胍。
	缓冲液/样品组成不正确	检测样品以及结合缓冲液的组成和pH值，确认样品中不存在高浓度的螯合剂或强还原剂，咪唑的浓度没有过高。

	组氨酸标签可能丢失	通过Western blot检测表达载体序列或用抗His抗体纯化
	温育时间过短	降低流速或增加孔中/每批样品温育时间或用更快速的离心/真空
组氨酸标签重组蛋白没有被完全洗脱下来		用更大体积的洗脱缓冲液洗脱，并/或增加洗脱缓冲液中咪唑的浓度。
组氨酸标签重组蛋白被发现 在沉淀中（在纯化过程中收集的SDS-PAGE样品表明大多数聚组氨酸标签重组蛋白在离心沉淀中）	超声可能不够充分	可以由显微镜观察或通过检测在260nm的紫外吸收间接检测核酸释放来检查细胞裂解状况。在超声前加入溶菌酶（最多0.1倍体积的10mg/ml溶菌酶溶于25mM Tris-HCl, pH8.0的溶液中）可能会使结果变好。避免起泡或样品变热，否则会使目的蛋白变性。过度超声也可能导致宿主细胞蛋白和目的蛋白共纯化。
	蛋白在纯化的过程中 吸附在细胞碎片上， 因而在离心过程中丢失	改变提取条件（pH值、离子强度，尝试用去垢剂溶解）
	目的蛋白可能不溶 （包涵体）	蛋白经常可以用通常的变性剂如4-6M盐酸胍，4-8M尿素或强去垢剂溶解（并去折叠）。准备含有20mM 磷酸钠、8M尿素或6M盐酸胍、合适浓度的咪唑、pH7.4到7.6的缓冲液。含有尿素的溶液应该也含有500mM 氯化钠。用这些缓冲液做样品制备并作为结合和洗脱缓冲液。对于样品制备和结合缓冲液，用5-40mM咪唑或者在优化实验中确定的咪唑浓度（包含尿素或盐酸胍）。为了使样品的稀释最小，可以加入固体的尿素或盐酸胍。
洗脱的蛋白不纯 （在SDS-PAGE上有多条带）	蛋白酶部分地降解目的蛋白	加入蛋白酶抑制剂（请小心使用EDTA）。
	杂蛋白对金属离子有高亲和性	用分步洗脱或咪唑浓度线性梯度洗脱来确定在结合和洗涤过程中最优的咪唑浓度。在样品中加入和洗涤缓冲液相同浓度的咪唑。在洗脱前用尽可能高浓度且不使目的蛋白洗脱的咪唑洗涤柱子。一个缓的梯度（20个柱体积或更多）可以分离具有相似结合能力的蛋白。如优化的条件仍不能除去杂蛋白，需要额外的纯化步骤。

	杂蛋白和标签蛋白结合。比如分子伴侣结合在目的蛋白上。	- 在超声前加入去垢剂和/或还原剂。增加去垢剂的浓度（比如至多2%的TritonX-100或2%的Tween20），或在洗涤缓冲液中加入甘油（最多50%）来破坏非特异相互作用。 - 考虑增加咪唑的浓度或改变用于纯化的金属离子种类。
	未结合的物质在洗涤过程中没有被充分移除。	重复上样后的洗涤过程以获得最优的产率。
组氨酸标签重组蛋白在样品上样或洗涤过程中被洗脱	杂蛋白可能对某种金属离子有高亲和力	更换用于纯化的金属离子种类
	缓冲液/样品的组成不是最佳	检测样品以及结合缓冲液的组成和pH值，确认样品中不存在高浓度的螯合剂或强还原剂，咪唑的浓度没有过高。
	组氨酸标签被阻隔了	在变性条件下纯化（用4-8M尿素或4-6M盐酸胍）
	过载	对于可应用的形式（如预装HisTrap柱），将2-3个柱子连接起来或更换更大的柱子
有气泡形成		未净化的样品可能在纯化过程中增加气泡的形成。在层析系统中加入限流阀可以避免这种现象的发生。如果加入了限流阀，需要把ÄKTA design系统的限压改变为0.5MPa（5bar）（柱子的压力为0.3MPa，限流阀的压力为0.2MPa）。
MultiTrap除去铝箔后有溶液的泄漏		在加入结合缓冲液前向孔中加入500µl去离子水。离心或真空方法中，在每次加入液体之间除去上次的液体。
MultirTrap在使用真空方法时，有可重复性的问题或者在收集板中发泡。		- 增加或降低真空度。 - 在洗脱前增加更多的洗涤步骤。改为离心方法。

第四章：优化纯化组氨酸标签重组蛋白

简介

在本章中讨论三种优化纯化组氨酸标签重组蛋白的方法：

- 优化咪唑浓度
- 优化使用不同的金属离子
- 优化使用多步纯化

组氨酸标签重组蛋白的一般纯化，包括典型的工作流程、可用介质和产品形式的描述、过程、问题解决提示的信息，请参照第三章。

优化咪唑浓度

存在暴露在表面的组氨酸残基或其它形成复合体的氨基酸可能导致无标签的宿主细胞蛋白非特异结合到纯化介质上。这些无标签蛋白和目的蛋白一同洗脱，并且必须随后除去。因为这些杂蛋白的亲和力通常比组氨酸标签重组蛋白低，所以有可能通过优化分离条件来分开杂蛋白和目的蛋白。

以下的一些例子显示改变咪唑浓度是如何影响组氨酸标签重组蛋白的纯度的。

1. 把咪唑作为竞争剂

在把咪唑作为洗脱剂的层析过程中，柱子需要用低浓度的咪唑预平衡。如果省略这一步骤，一旦咪唑被引入层析过程，就可能产生无法控制的效应。

一种降低层析过程中杂蛋白结合的方法就是使用咪唑作为竞争剂（见图45）。在展示的实验过程中，来源于 *Mycobacterium bovis* 的组氨酸标签的蛋白质激酶G（His)6-PknG）在最后纯化过程中的样品和结合缓冲液里使用了45mM的咪唑浓度。该实验采用的介质是Ni sepharose High Performance（见第三章）。

为了获得更高的蛋白浓度，蛋白采用两步梯度洗脱（图45A）。为了说明使用咪唑的优点，在相同条件下（除了样品和结合缓冲液中未加入咪唑）进行了额外纯化（图45B）。尤其需要注意的是不建议不加入咪唑。这个例子只是用来说明没有咪唑对于洗脱的目的蛋白纯度有负面的影响。

对洗脱组分的SDS-PAGE表明在样品和结合缓冲液中加入45mM咪唑后，目的蛋白的纯度有很大提高。注意咪唑的浓度是蛋白依赖的，而且必须具体蛋白具体分析。

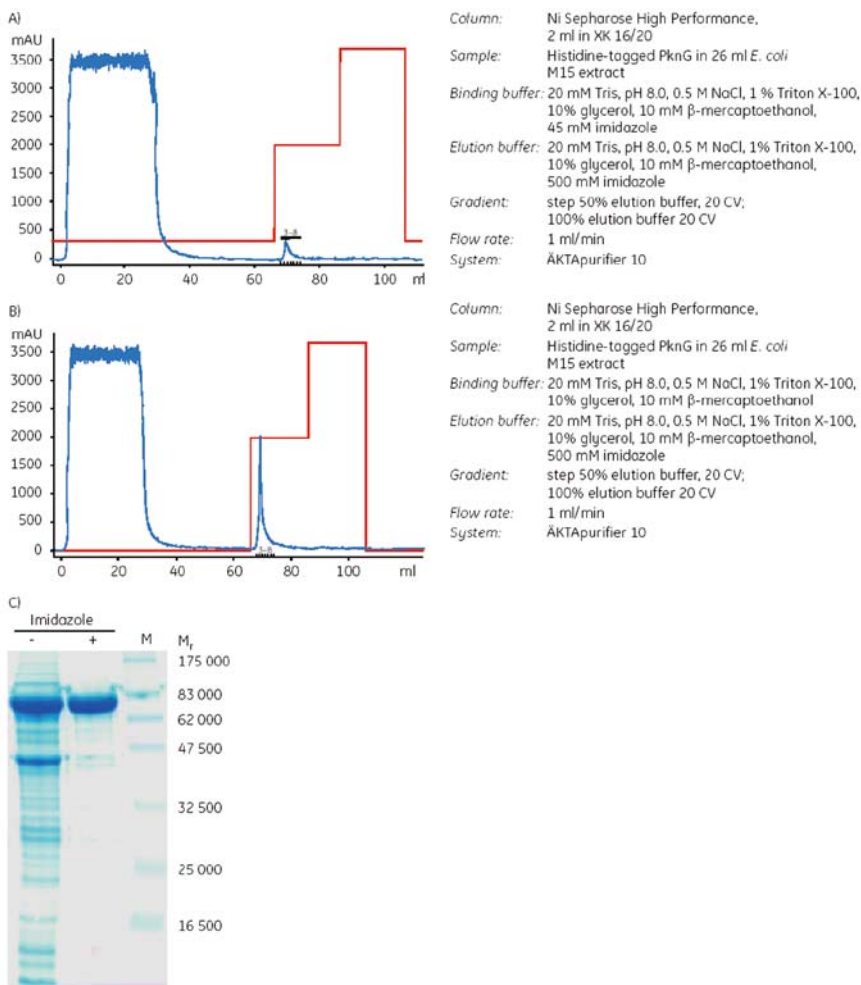


图45：在样品和结合缓冲液中有（A）和没有（B）45mM咪唑的情况下对His6-PknG的纯化。对于每次层析，从2升的大肠杆菌培养物中获得的26ml裂解物用0.45 μ m滤膜过滤后上样到2ml Ni Sepharose High Performnce（XK16/20柱），层析过程使用ÄKTApurifier。蛋白质激酶用50%和100%的洗脱缓冲液进行两步梯度洗脱。（C）12% SDS-PAGE 检测His6-PknG洗脱组分。（+）表示加入45mM咪唑的结果（-）表示没有加入咪唑的结果。

2. 用His SpinTrap确定最优的咪唑浓度

结合和洗涤过程中咪唑的浓度是影响目的蛋白最终纯度和产量的一个重要因素。His SpinTrap是用来确定最优咪唑浓度的一个方便快速的工具。优化对目的蛋白的纯度和产量都十分重要。一系列实验用可来说明这个问题：一种组氨酸标签蛋白 APB7-(His)₆（分子量28000）在样品和结合缓冲液中含有5、50、100和200mM浓度咪唑的条件下用His SpinTrap进行纯化。洗脱缓冲液中含有500mM的咪唑。

用5mM的咪唑浓度会导致洗脱样品的纯度较低（图46第3道），而增加到50mM咪唑阻止了大部分杂蛋白的结合，提高了纯度（图46第4道），样品和结合缓冲液中100mM的咪唑降低了产量但十分有限地提高了纯度（图46第5道）。将咪唑浓度提高到200mM进一步降低了产率（图46第6道）。

这个结果显示在结合过程中高浓度的咪唑能提高纯度，然而太高浓度的咪唑会降低产量。结合过程中最优的咪唑浓度是蛋白依赖的。对于很多蛋白来说，20到40mM的咪唑是最好的选择。

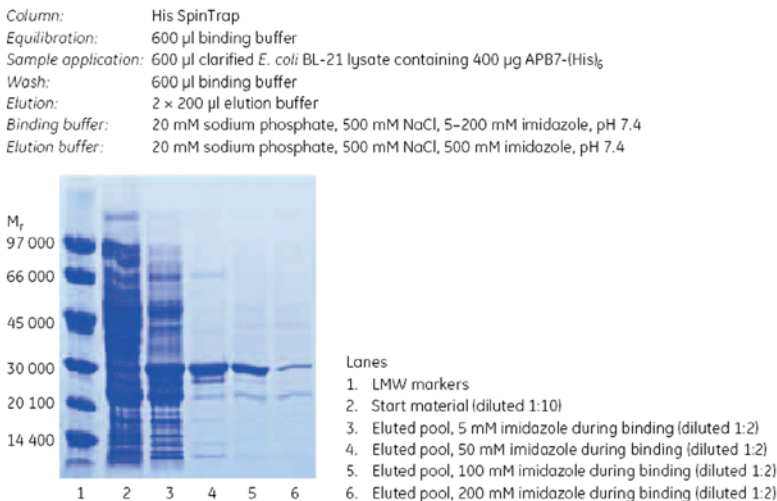


图46：组氨酸标签的APB7在还原条件下的SDS-PAGE（ExcelGel Gradient 8-18）电泳结果。结合过程中咪唑的浓度影响纯度和产率（比较第3、4、5、6道样品）



优化不同的金属离子

蛋白和金属离子的结合强度受多种因素影响：包括目的蛋白的结构和性质、蛋白亲和标签的有无和性质、金属离子的性质、结合缓冲液的pH值和组成。因此虽然Ni²⁺被认为能够与组氨酸标签重组蛋白有最强的亲和力，却不见得对某一给定的纯化是最优的选择。因此，在某些条件下，其它过渡族金属离子比如Ca²⁺，Co²⁺，Cu²⁺，Fe³⁺，Zn²⁺或许更加适合。

当目的蛋白的结合性质未知时，我们建议尝试多于一种金属，再来确定最适合分离的那种。基于这个目的，GE Healthcare提供了几种未装载金属离子的IMAC纯化产品：预装的1ml和5ml HiTrap IMAC HP和HiTrap IMAC FF柱，20ml HiPrep IMAC FF 16/10柱子，还提供有IMAC Sepharose High Performance 和 IMAC Sepharose 6 Fast Flow介质。这些产品的介绍以及使用过程在第3章有介绍。

如下的条目可能会帮助设计一个初步实验用来确定对某个纯化最适合的金属离子：

- Ni²⁺离子一般用于纯化组氨酸标签重组蛋白。
- Co²⁺离子也可以用于纯化组氨酸标签重组蛋白，尤其当希望目的蛋白的结合能力弱的时候。
- Cu²⁺和Zn²⁺离子经常用来纯化无标签蛋白。Cu²⁺一般与多种蛋白都能强结合。有些蛋白只会结合Cu²⁺。Zn²⁺离子通常结合得更弱一些，这一特征经常用来选择性洗脱目的蛋白。Cu²⁺和Zn²⁺离子都可以用来纯化组氨酸标签重组蛋白并且用于处理规模化分离。
- Fe³⁺和Ca²⁺同其它金属离子相比使用得更少一些。当操纵Fe³⁺离子时需要额外小心，因为它容易在中性溶液中还原，形成难以溶解的化合物。当在低pH值（大概在3左右）工作时，应把金属离子固定在柱材上以避免沉淀。我们也建议在每次运行后都对固定的Fe³⁺离子进行剥离，然后按照要求再装载。去除强结合的Fe³⁺离子和铁化合物可通过把介质置于50mM EDTA 中过夜来实现。

下面我们展示两个例子说明选择最合适的金属离子和实验条件（包括咪唑的浓度）能够影响给定目的蛋白的纯化。

1. 在HiTrap IMAC FF上使用Cu²⁺、Zn²⁺和Ni²⁺离子的比较研究

本研究中，在大肠杆菌BL-21中表达的6组氨酸标签APB7蛋白（分子量28000）在分别装载了Cu²⁺，Zn²⁺，Ni²⁺离子的HiTrap IMAC FF 1ml柱（预装了IMAC Sepharose 6 Fast Flow介质）上进行纯化。

进行筛选实验已确定针对每种离子最优的咪唑浓度（见图47（A到C））。这些三次纯化的结果表明：

- 使用20mM咪唑浓度时，装载了Cu²⁺和Zn²⁺离子的柱子在洗涤过程中目的蛋白有显著的泄漏，这是咪唑浓度太高而不能达到最大产率的征兆。用Ni²⁺离子则只有很少的泄漏。三种情况的纯度都非常好。
- 使用10mM咪唑浓度时，装载了Cu²⁺和Zn²⁺离子的柱子在洗涤过程中目的蛋白的泄漏有显

著降低，三种情况下收集的洗脱组分目的蛋白纯度基本相似，但是不如20mM咪唑时纯。

- 使用5mM咪唑浓度时，对于任何一种金属离子都没有泄漏。Ni²⁺离子提供了最纯的蛋白，但仍然不如20mM咪唑时纯。

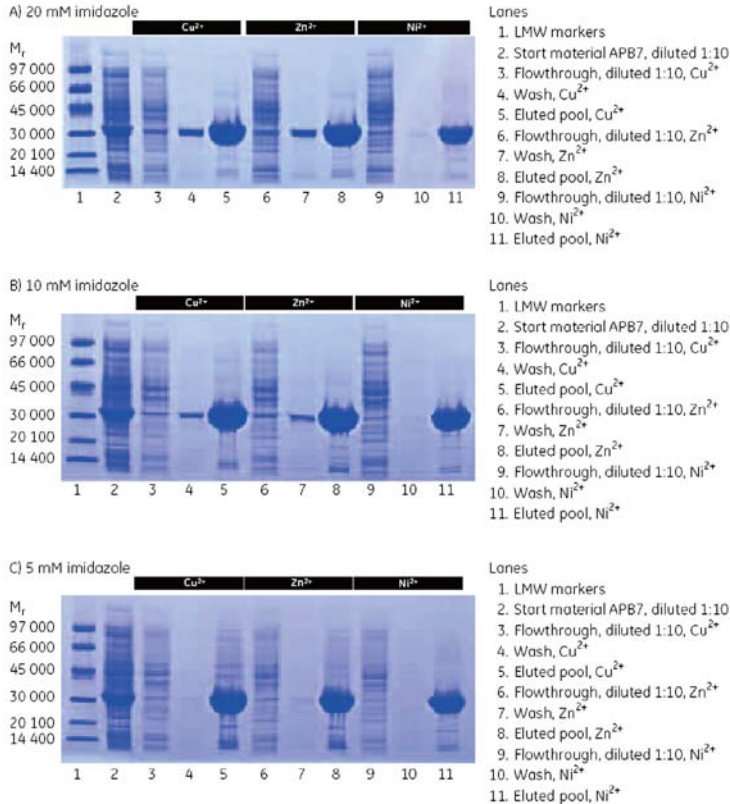


图47：还原条件的SDS-PAGE分析用预装的HiTrap IMAC FF 1ml柱（填装了IMAC sepharose 6 Fast Flow介质）纯化APB7蛋白的结果。柱子装载了Cu²⁺，Zn²⁺，Ni²⁺离子，并在样品中包含了（A）20mM咪唑（B）10mM咪唑（C）5mM咪唑。电泳胶用考马斯亮蓝染色。

注意在SDS-PAGE中上样的蛋白量很大，这用来显示存在于洗脱蛋白中的杂蛋白。

这些结果说明，对于任何一种给定的金属离子，都可以调整咪唑的浓度以获得高产率、高纯度或成功的折衷。IMAC Sepharose介质同市场上销售的其它类似的IMAC介质相比，在洗涤缓冲液中通常需要稍微高一些的咪唑浓度。对于大多数分离来说，在结合和洗涤缓冲液中加入20-40mM浓度的咪唑是一个较好的起始点。确认使用高纯度的咪唑，这会在280nm处无紫外吸收或低吸收。如需要把咪唑从蛋白中除去，请根据样品的体积使用Hitrap Desalting、PD-10 Desalting或HiPrep 26/10 Desalting脱盐柱。

2. 在HiTrap IMAC HP上使用Cu²⁺、Zn²⁺、Co²⁺和Ni²⁺离子筛选最优的纯度

成功的纯化需要注意目的蛋白的性质以及目的蛋白与所用金属离子的亲和力。四根预装了IMAC Sepharose 6 High Performance介质的HiTrap IMAC HP 1ml柱子分别装载了四种金属离子：Cu²⁺、Zn²⁺、Co²⁺和Ni²⁺。纯化的性能通过纯化在大肠杆菌中表达的目的蛋白APB7（分子量 28000）进行评估。

这些结果说明针对某一特定蛋白通过筛选样品来确定最适合的金属离子以及纯化条件的重要性。对APB7来说，用Co²⁺或Ni²⁺能达到最高的纯度，但是和Cu²⁺与Zn²⁺相比，差别非常小（图48）。在这些例子中，使用咪唑的线性梯度洗脱结果同时也提供了一个为特定纯化选择合适的咪唑浓度的方法。

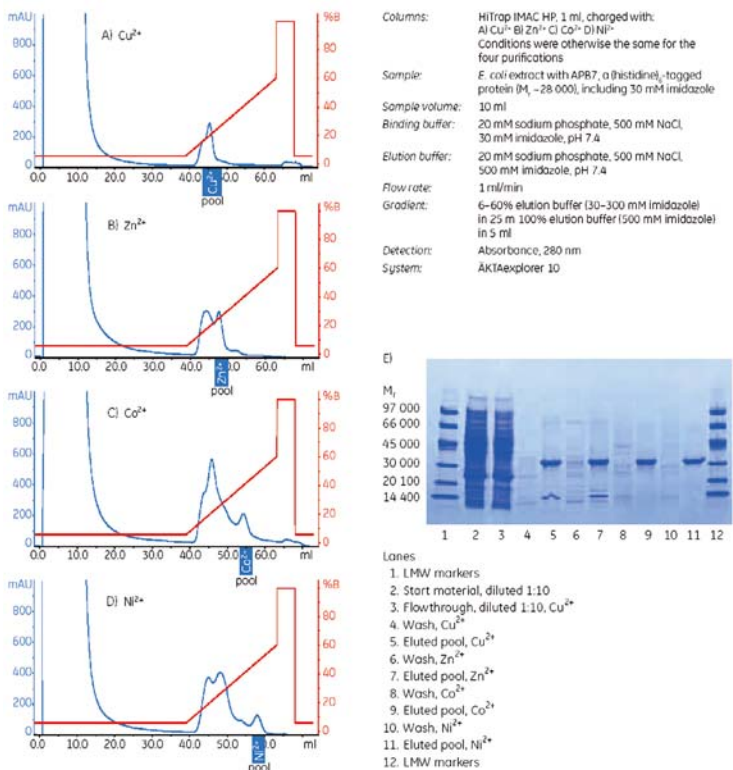


图48：大肠杆菌BL-21表达的组氨酸标签的APB7在四种装载了（A）Cu²⁺（B）Zn²⁺，（C）Co²⁺（D）Ni²⁺离子的HiTrap IMAC HP 1ml柱上纯化的结果。在每1ml组分电泳后（数据未显示）选取的组分在还原条件下进行SDS-PAGE（ExcelGel SDS Gradient 8-18）分析（E），考马斯亮蓝染色。

用多步纯化优化

目的蛋白可以进一步进行额外的一步或多步纯化，正如下面的例子所示。这个话题在第7章会详细讨论。

下面，我们展示两个例子，显示目的蛋白成功被多步纯化。

1. 用亲和层析和凝胶过滤层析两步纯化高分子量的（His）10标签蛋白

在两步纯化大肠杆菌中表达的(His)10-trx-P450（在N端有10个组氨酸构成的标签）过程中，HisTrap FF用于第一步纯化。洗脱的组分随后上样到HiLoad 16/60 Superdex 200 pg 柱中，进行凝胶过滤层析的进一步纯化。

在第一步纯化后，可检测到三条主带（图49B，第5道）。第6道（凝胶过滤层析的第2个组分）含有全长的目的蛋白。第7道和第8道（分别为第3和第4个组分）是目的蛋白的截短形式，正如N段测序验证的一样（结果未展示）。第9道（凝胶过滤层析的第1个组分）含有聚集蛋白。这样，随后的凝胶过滤层析提供了截短形式和全长（(His)10-trx-P450）形式之间非常好的分离效果。

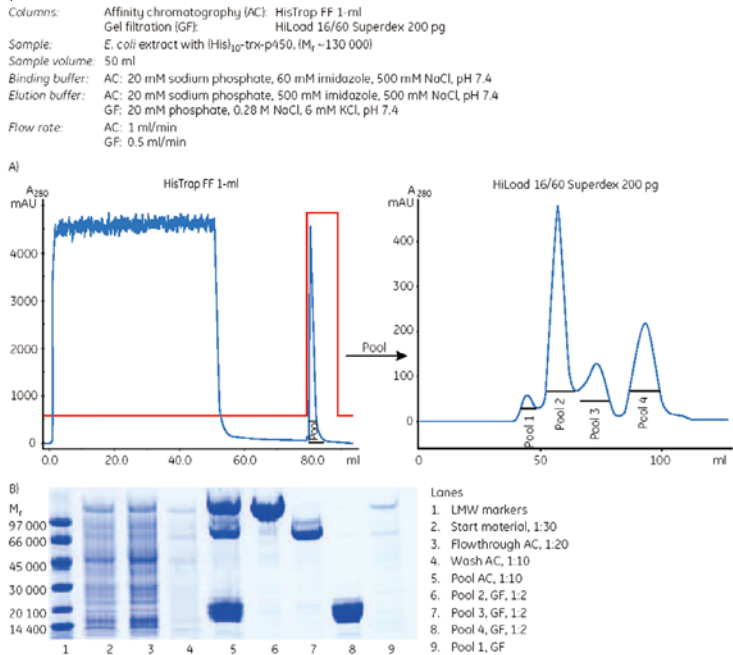


图49：（A）用亲和层析和凝胶过滤层析两步纯化高分子量的(His)10-P450蛋白。（B）非还原条件下的SDS-PAGE结果，考马斯亮蓝染色。

2. 在ÄKTAexpress上自动进行三步纯化未净化的细胞裂解物

一个自动进行的三步纯化方案用于从100ml未净化的大肠杆菌细胞裂解物中纯化组氨酸标签的麦芽糖结合蛋白。这三步是：用HisTrap FF crude 1ml柱进行亲和层析（AC）、用HiPrep 26/10脱盐柱进行脱盐（DS），用Mono Q TM 5/50 GL 进行离子交换层析（IEX）。这些在图中显示为AC-DS-IEX。如SDS-PAGE中所显示，该纯化过程获得了高纯度高产量的目的蛋白。

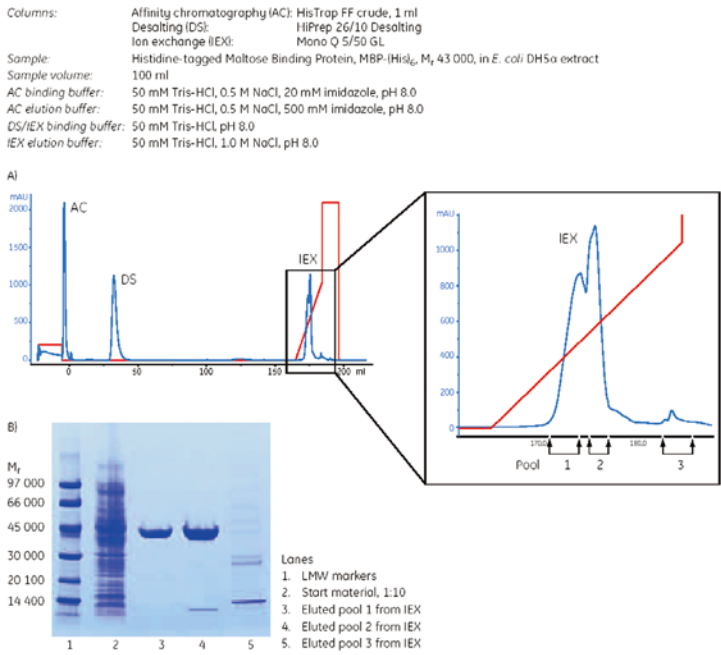


图50：（A）AC—DS—IEX的纯化结果。IEX的峰图的放大版和收集的组分显示在右侧。产率：在收集组分1和2中总共有9.4mg蛋白。（B）从IEX上洗脱的收集组分的SDS-PAGE电泳结果。胶用考马斯亮蓝染色。

第五章 GST标签蛋白的纯化

简介

谷胱甘肽S-转移酶（GST）亲和标签从1988年开始使用，至今已经成为纯化重组蛋白的常用方法，该方法以GST能够与偶联在介质上的谷胱甘肽配体结合为基础。带有GST标签的蛋白与配体的结合是可逆的，能够在温和、非变性的条件下通过加入还原型的谷胱甘肽被洗脱下来，因此这一纯化过程使得蛋白的抗原性能以及功能得以保护。

GE Healthcare的GST基因融合系统是在大肠杆菌中表达、纯化并检测GST标签蛋白的一个多功能系统。该系统包括pGEX表达载体、GST纯化产品以及GST检测试剂盒三种成分，一系列位点特异性的蛋白酶可作为这一系统的补充。

GST天然存在于大多数生物体内，带有全长GST标签的蛋白被证实仍旧具有GST酶的活性，同样能够二聚化。构建在pGEX载体上的重组日本血吸虫（*Schistosoma japonicum*）GST蛋白（分子量26Kd）的晶体结构已经被解析。

pGEX载体用于构建可诱导、高水平表达的基因或基因片段，这些基因都融合有*S. japonicum* 的GST蛋白，在大肠杆菌中表达的融合蛋白的N端带有GST标签。

GE Healthcare有多种亲和层析相关产品，分别将谷胱甘肽交联到Sephacrose High Performance（HP），Sephacrose 6 Fast Flow（FF）或Sephacrose 4B等不同介质上。Glutathione Sepharose介质产品有多种不同的形式，包括96孔过滤板、预装的HiTrap和HiPrep柱以及供实验室自装用的柱材（柱材包装从25ml到500ml不等）。这些柱材在性能参数上有区别，并且有不同的形式可供在规模和方便度方面进行选择。

GST标签可根据需要由位点特异的蛋白酶切除，pGEX质粒上多克隆位点上游包含有蛋白酶的识别序列。带有标签的蛋白可通过比色法或免疫学方法进行检测，有关蛋白酶切割和蛋白检测的问题在本章稍后会有讨论。

本章总结了处理GST标签蛋白的关键所在，主要集中介绍蛋白的纯化方法。若需要有关GST系统的详细信息，请参考《GST基因融合系统手册》（货号18-1157-58），该手册详细介绍了表达、纯化、检测和切除GST标签的详细信息，为使用这个系统的研究者提供了非常有价值的指导。

表达

正确的蛋白表达策略首先要选用合适的表达载体，需要兼顾考虑编码框、克隆位点、蛋白酶切位点等多种因素。插入片段必须具备正确的编码框和插入方向以及末端与载体相容等条件。选择宿主细胞需要考虑其克隆、细胞培养及蛋白的预期表达水平等问题；总之，生长条件必须保证蛋白最佳的表达水平。这些因素在下面将会被详细讨论。

pGEX载体

带有GST标签的蛋白通过将特定的基因或基因片段插入到pGEX载体的多克隆位点区构建而成，融合蛋白在tac启动子的调控下被乳糖类似物IPTG诱导表达。所有的pGEX载体都带有lacIq基因，该基因的表达产物作为一种抑制因子能够结合在tac启动子的操纵子区，使其只有在IPTG存在的条件下才能启动转录，因此严格控制着插入片段的表达情况。

温和的洗脱条件使蛋白的抗原性能和活性都得以最大程度的保留，同时这一系列载体具有多种不同的蛋白酶切位点如表15所示。

表15：pGEX系列载体的蛋白酶切位点。

载体	用于切割的蛋白酶
pGEX-6P-1, pGEX-6P-2, pGEX-6P-3	PreScission Protease
pGEX-4T-1, pGEX-4T-2, pGEX-4T-3	凝血酶
pGEX-5X-1, pGEX-5X-2, pGEX-5X-3	凝血因子Xa
pGEX-2TK	凝血酶
可以用体外直接标记的方法检测表达的蛋白	

这些载体由EcoRI位点开始提供了三种翻译编码框（见附录7），载体上相同的多克隆位点使得插入片段可以方便地连接到不同载体中。pGEX-6P-1、pGEX-4T-1和pGEX-5X-1能够直接克隆和表达来自λgt11基因文库的cDNA片段。

pGEX-2TK的多克隆位点与其它载体不同，它可用于检测在体外直接标记的相应标签蛋白。该载体含有心肌来源的依赖于cAMP的蛋白激酶催化亚基的识别序列，这一序列位于载体上凝血酶识别序列和多克隆位点之间，使得表达出的蛋白可以直接用蛋白激酶和[γ-32P]ATP标记并能通过同位素或放射自显影的方法检测。

附录7详细比较了pGEX系列载体的区别，每个载体完整的DNA序列和酶切位点信息请参阅GE Healthcare网页（<http://www.gehealthcare.com/lifesciences>），也可在GeneBankTM中查询，查询号参见附录7。

 选择合适的与插入片段蛋白编码框相一致的载体。

 选择适用于目的蛋白的蛋白酶及酶切反应条件。

pGEX-6P PreScission蛋白酶系列载体为切除GST标签和纯化蛋白提供了诸多便利条件。将蛋白酶结合到柱子上的同时即可进行位点特异性的切割，蛋白酶在低温条件下有较高的活性，因此为保证目的蛋白的完整性所有步骤都必须在冷室中进行。蛋白酶和GST标签可同步被去除，详见本章稍后部分。

宿主

虽然多种大肠杆菌都能够克隆和表达pGEX载体，但一些特殊的工程菌株可能更适合表达全长的标签蛋白，产量也可能更高。一些胞质蛋白酶Lon、OmpT、DegP或HtpR缺失的菌株能够有效保护目的蛋白不被宿主菌降解。

冻干状态（非感受态）的大肠杆菌BL21随pGEX载体一同提供，也可单独购买。



使用蛋白酶没有缺失的菌株可能会引起标签蛋白被蛋白酶解，因而可能在SGS-PAGE或蛋白免疫印迹分析检测中出现许多条带。

大肠杆菌BL21缺失OmpT和Lon两种蛋白酶，能够较高水平表达蛋白，因而是研究表达GST标签蛋白的比较合适的宿主菌株。



由于BL21的转化效率较低，在克隆和扩增载体时可以使用其它菌株（如JM105），但扩增pGEX载体不能使用带有recA1等位基因的大肠杆菌，有报道称这些菌株能够引起质粒DNA内部的重组或缺失。

插入片段DNA

插入DNA片段的编码区不能超过2Kb，无论从别的载体上亚克隆还是通过PCR扩增，插入片段的末端必须保证能与线性化的载体末端互补。定向克隆使用两种不同的内切酶，这样可以使片段插入到正确的方向。

优化表达

插入片段的方向和与载体的连接确定无误后，下一步将要优化标签蛋白的表达。这一步骤的关键是从多个克隆中筛选得到最佳的蛋白表达水平及相应的生长条件，这些条件确定之后就可以进行大规模培养。

同时进行多个克隆的筛选有一些纯化方法可供借鉴。一种方法即使用GST MultiTrap 4B的96孔板，主要用于直接从浑浊的细胞裂解液中同时纯化GST标签蛋白（每孔最多600μl）。另一种方法可以筛选2-3ml菌液的裂解物，使用一种Glutathione Sepharose介质进行批量纯化。第三种方法可使用GST SpinTrap纯化模块，这种模块能够使用标准微型离心机从最多12ml的菌液中纯化出蛋白。以上这些方法在本章稍后都有介绍。

另外本章稍后对于表达水平的检测也提供了一些参考。

生长条件应考虑最佳的蛋白表达水平，确定一系列诸如培养基、生长温度、密度、诱导条件等参数。保证足够的通气条件、缩短各个生长时期的时间以及使用正确的抗生素进行筛选都是非常重要的。同时应当及时监测包涵体并通过优化相应的条件避免其形成，这一问题将在第8章中讨论。



在每个参数条件下都应监测细胞密度（600nm的吸光度）和蛋白表达水平。

纯化

GST标签蛋白可以通过亲和层析比较方便地通过诸如Sepharose等谷胱甘肽交联的介质从细菌裂解物中纯化（图51）。使用亲和介质时，标签蛋白与配体结合，杂质通过结合缓冲液被洗脱去除，之后标签蛋白在温和、非变性的条件下从Glutathione Sepharose上被洗脱下来，这样使蛋白的抗原性能和功能得以保护。

如果需要将GST标签从目的蛋白上切除，标签蛋白可以在与Glutathione Sepharose结合时使用合适的位点特异性蛋白酶酶切，也可在洗脱之后再酶切（这两种方法本章稍后都有介绍）。在标签蛋白与介质结合时酶切可以节省分离GST标签与目的蛋白的步骤，因为这样在洗脱目的蛋白时GST标签仍旧结合在介质上。

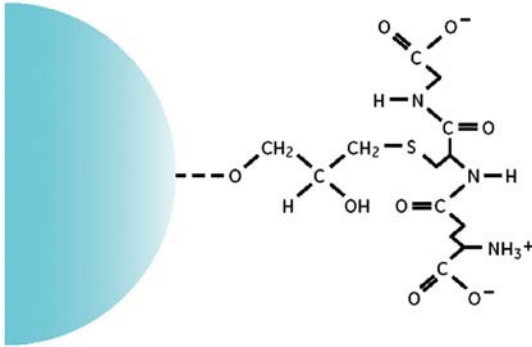


图51: Glutathione Sepharose的终端结构。谷胱甘肽通过SH基团与Sepharose基质的环氧乙烷基团通过环氧激活特异偶联到Sepharose上，谷胱甘肽的结构与GST的结合位点互补。

选择GST标签蛋白纯化的产品

根据特定的纯化需求可以选用不同的产品来纯化GST标签蛋白，如表16所示。这些产品分别通过重力流、离心、真空、注射器或泵使用亲和层析的方法纯化蛋白。三种Glutathione Sepharose介质的物理特征比较详见附录2。

表16：GST标签蛋白纯化方法选择指南，包括一些补充产品。

产品	板子/柱子	板子/柱子载量	描述	应用
Glutathione Sepharose High Performance	大小 25ml 100ml	约10mg (rGST)	实验室自装	用于高分辨并洗脱更浓的样品（高效纯化）
Glutathione Sepharose 4 Fast Flow	25ml 100ml 500ml	约10mg (rGST)	实验室自装	由于结合能力和流动性能较好，适合于规模化放大。
Glutathione Sepharose 4 B	10ml 100ml (功能检测过) 300ml	>5mg (rGST)	实验室自装	结合能力好
Glutathione Sepharose 4 B	2ml	最多10mg（马肝脏GST）	2根预装了 Glutathione Sepharose 4 B的柱子	重力流，不需要系统
GST MultiTrap FF	50 μl	最多0.5mg (rGST)	用 Glutathione Sepharose 4 Fast Flow预装的96孔过滤板。	用于高通量表达筛选。可以用机器人或手动采用离心或真空方法。
GST MultiTrap 4B	50 μl	最多0.5mg (rGST)	用 Glutathione Sepharose 4 B 预装的96孔过滤板。	用于高通量表达筛选。可以用机器人或手动采用离心或真空方法。
GST SpinTrap 纯化模块	50 μl	最多0.4mg (rGST)	50根柱子和试剂。预装了 Glutathione Sepharose 4 B。	用小离心机进行纯化。可进行中等通量的表达筛选和小量制备。
GSTrap HP	1ml 5ml	约10mg 约50mg (rGST)	预装了 Glutathione Sepharose High Performance的柱材。	优先采用蠕动泵或层析系统。也可以使用注射器。可以进行高分辨的纯化，洗脱更浓的样品（高效纯化）。

产品	板子/柱子大小	板子/柱子载量	描述	应用
GSTrap FF	1ml	约10mg	预装了 Glutathione	可以用注射器，蠕动泵或层析系统进行纯化。提供良好的流动性能。规模化放大。
	5ml	约50mg (rGST)	Sepharose 4 Fast Flow的柱材。	
GSTrap4B	1ml	>5mg	预装了 Glutathione	可以用注射器，蠕动泵或层析系统进行纯化。提供良好的流动性能。规模化放大。
	5ml	>25mg (马肝脏GST)	Sepharose 4 B的柱材。	
GSTPrep™ FF16/10	20ml	约200mg (rGST)	预装了 Glutathione Sepharose 4 Fast Flow的柱材。	使用层析系统，规模化纯化。
pGEX载体 (GST基因融合系统)	5到25 μg载体	N/A	载体和BL21大肠杆菌	tac启动子用于化学诱导，高水平表达。PreScission，凝血酶或凝血因子Xa蛋白酶识别位点。
抗GST抗体	0.5ml	50次检测	抗GST抗体	多克隆。用于进行GST标签蛋白灵敏特异的检测。和酶联的抗山羊抗体共同使用。
偶联了HRP的GST抗体	75ul	通常使用浓度为1:5000稀释	偶联了HRP的高特异GST抗体。并且优化和ECL检测试剂一同用于蛋白质免疫印迹分析。	多克隆。提供对GST标签蛋白检测的速度、灵敏度、安全。识别GST的多个表位，因而检测不依赖于功能性的GST。
GST96孔板检测模块	5块板子载有HRP偶联的抗GST抗体和GST蛋白	N/A	GST96孔板检测模块	板子预先用抗GST抗体包被，并且封闭用于捕获GST标签蛋白，而后用HRP偶联的GST抗体检测。
ECL GST蛋白质免疫印迹检测试剂盒	可用于1000或3000cm ² 的膜	ECL Plus溶液A和ECL Plus溶液B	基于二氢化吡啶的底物	用于化学发光和化学荧光检测。延长了的信号持续时间可以进行多次曝光。

产品	板子/柱子大小	板子/柱子载量	描述	应用
PreScission Protease	500单位	一个单位可以以高于90%的效率切割100 μ g GST标签蛋白。切割条件是1mM EDTA, 1mM DTT, 150mM 氯化钠, 50mM Tris-盐酸 (pH7.0), 在5° C温浴16小时。	PreScission Protease	用于在Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro序列中的Gln和Gly中间进行特异的, 低温酶切。标签蛋白由人的鼻病毒蛋白酶和GST组成。当PreScission蛋白酶序列在标签序列和目的蛋白之间时, 可用该酶酶切。比如用pGEX-6P载体表达的GST标签蛋白。
凝血酶	500单位	一单位能够以高于90%的效率切割100 μ g检测的GST标签蛋白。酶切条件是在22° C 1× PBS中进行16小时。	凝血酶	用于在凝血酶识别序列中进行特异的酶切。当凝血酶识别序列在标签序列和目的蛋白之间时, 可以用于标签切割。比如用pGEX-T载体表达的GST标签蛋白。
凝血因子Xa	400单位	一单位能够以高于90%的效率切割100 μ g检测的GST标签蛋白。切割条件是1mM 氯化钙, 100mM 氯化钠, 50mM Tris-盐酸 (pH8.0), 在22° C切割16小时。	凝血因子Xa	对于在Ile-Glu-Gly-Arg四肽后进行特异的酶切。当凝血因子Xa 识别序列在标签序列和目的蛋白之间时, 可以用于标签切割。比如用pGEX-X载体表达的GST标签蛋白。
HiTrap Benzamidine FF (High Sub)	1ml 5ml	≥ 35 mg胰蛋白酶 ≥ 175 mg胰蛋白酶	预装了 Benzamidine Sepharose4 Fast Flow (High Sub柱材)	用于除去丝氨酸蛋白酶, 比如在标签切割后除去凝血酶, 凝血因子Xa。
Benzamidine Sepharose 4 Fast Flow (High Sub)	25ml	≥ 35 mg胰蛋白酶/每毫升柱材	实验室自装	用于除去丝氨酸蛋白酶, 比如在标签切割后除去凝血酶, 凝血因子Xa。
收集板	96孔板	500 μ l	V 型底部	和GST MultiTrap产品一起使用。

纯化GST标签蛋白的基本要求

蛋白的性质、宿主菌、表达和纯化条件的不同都可能使得最终标签蛋白的产量有很大差别，浓度可能从1mg/l到10mg/l不等。表17可用于估算蛋白平均产量为2.5mg/l时所需的培养体积。

表17：不同蛋白产量所需的试剂的体积。

标签蛋白产量	50mg	10mg	1mg	50 μ g
培养体积	20l	4l	400ml	20ml
裂解体积	1l	200ml	20ml	1ml
Glutathione	10ml	2ml	200 μ l	10 μ l
Sepharose柱材				
体积				
1×PBS1	100ml	20ml	2ml	100 μ l
谷胱甘肽洗脱缓	10ml	2ml	200 μ l	10 μ l
冲液				

这是每次洗涤所需体积。在随后的步骤中，每个样品需要洗涤三次。

样品或缓冲液应用去离子水（或双蒸水）配制，样品应在使用前离心并（或者）用0.45μm滤膜过滤。为防止因样品太粘稠造成柱子堵塞，可用超声、匀浆方法等处理或使用DNase或RNase消化以减小核酸片段的长度。

 流速是影响GST标签蛋白与Glutathione Sepharose结合的重要参数之一。由于谷胱甘肽与GST结合的动力学常数比较低，因此保持较慢的流速对于促进二者之间的结合非常重要。

省时起见，洗涤和洗脱可以使用比较快的流速，批量纯化时还需考虑培养时间。

适当调节样品适应结合缓冲液的组成可以提高标签蛋白的结合能力，可以用结合缓冲液稀释样品或在更换缓冲液时使用诸如HiTrap Desalting 5ml、PD-10 Desalting或HiPrep 26/10 Desalting等脱盐柱。有关脱盐柱的使用详见第九章。

不同标签蛋白最终使用的洗脱体积和时间可能有很大差别，最后使用高浓度的谷胱甘肽（20-50mM）洗脱可以提高产量。当使用浓度高于15mM的谷胱甘肽时，为保证pH值在6.5到8之间应相应增加缓冲液的浓度。必要时柱子的穿透、洗涤和洗脱样品都应该用SDS-PAGE和蛋白免疫印迹分析以检测其中带有GST标签的蛋白。

洗脱之后可能还有相当一部分标签蛋白结合在介质上，不同蛋白需要的洗脱体积和时间可能不同，此时可能需要进一步洗脱。洗脱物可以用SDS-PAGE或1-氯-2, 4-二硝基苯（CDNB）等方法检测GST标签的蛋白（见本章稍后部分）。

 若需要蛋白单体则应把GST标签切除，凝胶过滤可能会产生一些不稳定的单体，它们会很快二聚化。

 文献中经常提到批量制备的步骤，而预装柱和易装的Glutathione Sepharose介质则提供了更加方便快捷的方法。如果GST标签不能完全暴露或在细菌裂解物中目的蛋白的浓度很低（这两种情况都会导致亲和层析的产量很低），有时会使用批量制备的方法。一个能提高产量的更方便的方法是降低流速或者把样品多次穿过同一柱子（再循环）。

本章稍后提到的多种检测方法均可用于监测纯化过程。GST检测模块可以通过酶学或免疫化学方法检测提取物和纯化过程中样品的GST标签蛋白的浓度。

纯化样品的最终蛋白产量也可用标准比色法检测（如Lowry、BCA、Bradford等方法）。如果使用Lowry或BCA相关的检测方法，首先必须用诸如HiTrap Desalting 5ml或2000倍体积的PBS透析除去纯化材料中的谷胱甘肽，Bradford方法可以在谷胱甘肽存在的条件下工作。



根据样品的性质，纯化柱和亲和介质可以被重新使用，但是必须用于同样的样品以避免交叉污染。

选择纯化设备

设备的选择取决于特定的纯化过程。许多纯化过程可以使用简单的方法及设备，如组合使用预装的HiTrap柱和注射器即可进行逐步洗脱。从真核宿主中提取GST蛋白时使用线性梯度可以增加纯度，这是因为使用逐步洗脱时能够将内源的GST一同洗脱下来。如果需要连续使用同一柱子运行多次，最好使用专用系统。第2章表8提供了正确选用纯化系统的指南。



对于小规模纯化或高通量筛选，我们推荐使用GST MultiTrap FF或GST MultiTrap 4B 96孔过滤板，每孔能够纯化出最多0.5mg的GST标签蛋白。另外含有50 μ l Glutathione Sepharose 4B的GST SpinTrap柱能够纯化出最多400 μ g的GST重组蛋白。



对于大规模纯化GST标签蛋白，预装柱如GSTrap和GSTPrep FF 16/10是比较好的选择。为增加容量可将几个GSTrap柱（1ml或5ml）或者两个GSTPrep FF 16/10柱（20ml）串联起来，若需要更大的容量，可以将Glutathione Sepharose介质装在合适的柱子中。

色谱系统如ÄKTAprime plus等比较适合用于简捷迅速、可再生的纯化过程，因为这一系统对包括纯化组氨酸标签和GST标签蛋白等诸多典型的步骤都有预定的方法。UV、电导监测和使用方便的软件可以比较容易地自动跟踪蛋白，而且这种监测是实时连续的，因而可以避免操作错误。对于需要记录并跟踪所有实验数据或需要多步纯化、发展和优化实验方法并（或）进行大量实验的实验环境，推荐使用ÄKTApurifier 或ÄKTAexplorer色谱系统。

使用Glutathione Sepharose High Performance、Glutathione Sepharose 4 Fast Flow和Glutathione Sepharose 4B纯化蛋白

这三种介质均可用于纯化GST标签蛋白和其它S转移酶或依赖于谷胱甘肽的蛋白，它们适用于温和的洗脱条件因此使蛋白的抗原性能和功能得以保持。这些产品都提供有多种预装形式并溶胀在20%的乙醇中，如本章稍后介绍的GSTrap。附录2列出了所有Glutathione Sepharose介质的主要特征。

Glutathione Sepharose High Performance中的谷胱甘肽配体偶联到6%高度交联的琼脂糖上，该介质的平均孔隙为34 μ m因而比较适合高分辨率的纯化和更高浓度样品的洗脱。

Glutathione Sepharose 4 Fast Flow中的谷胱甘肽配体偶联在4%高度交联的琼脂糖上，其平均孔隙为90 μ m，由于其出色的结合容量和流速特征，它非常适用于规模化放大。这一介质也比较适合批量和重力流纯化。

Glutathione Sepharose 4B中的谷胱甘肽配体偶联在4%的琼脂糖上，平均空隙为90 μ m，结合容量比较高，适用于小规模纯化，同时也适用于批量和重力流纯化。

Glutathione Sepharose 4 Fast Flow和Sepharose 4B产品提供有预装的96孔过滤板（见第120页）。

批量纯化和柱纯化GST标签蛋白的过程见后面。



图52：用于纯化GST标签蛋白的Glutathione Sepharose High Performance和Glutathione Sepharose 4 Fast Flow。

使用Glutathione Sepharose HP、Glutathione Sepharose 4 FF或Glutathione Sepharose 4B批量纯化GST标签蛋白

开始本步骤之前请参考第114页的基本要求。

准备样品

1. 裂解细胞
2. 将细胞裂解物于4° C高速离心10分钟，并经0.45 μ m滤膜过滤后再使用Glutathione Sepharose介质。若样品特别粘稠可用结合缓冲液稀释、增加裂解处理（超声或匀浆）或用DNase或RNase处理。

准备缓冲液



应使用高纯度的试剂和水配置溶液，所有溶液在使用前都须经0.45 μ m滤膜过滤。

结合缓冲液：PBS（140mM 氯化钠，2.7mM 氯化钾，10mM 磷酸氢二钠，1.8mM 磷酸二氢钾），pH 7.3

洗脱缓冲液：50mM Tris-HCl，10mM还原型谷胱甘肽，pH 8.0



为增加纯度可在结合缓冲液和洗脱缓冲液中加入1-20mM DTT，但这样可能会降低产量。

准备批量纯化需要的Glutathione Sepharose介质

Glutathione Sepharose介质溶胀存储在20%的乙醇中，其中含有50%体积的介质。

1. 确定纯化所需的Glutathione Sepharose介质的柱床体积。
2. 温和摇晃瓶子使介质重悬。
3. 用移液枪或量筒量取适当体积的介质放入合适的容器中。
4. 500×g离心5分钟使介质沉降，小心去除上清。
5. 每毫升（含有50%的柱材）Glutathione Sepharose HP、FF或4B介质加入5ml PBS漂洗。
 Glutathione Sepharose介质必须用PBS彻底漂洗以除去贮存液中的乙醇，痕量的乙醇可能会影响后续的实验。
6. 500×g离心5分钟使介质沉降，小心去除上清。
7. 再次重复步骤5和6一次。

有关介质清洗、贮存和处理的信息请参考附录2。

批量纯化

1. 将细胞裂解物加入到准备好的Glutathione Sepharose介质中室温温育至少30分钟，温育过程中温和转动。
2. 用移液枪或量筒将上述混合物转移到合适的容器中。
3. $500\times g$ 离心5分钟使介质沉降，仔细将上清（即为穿透）移出并用SDS-PAGE检测以确定GST标签蛋白与介质的结合效率。
4. 每毫升Glutathione Sepharose介质加入5毫升PBS漂洗，翻转混匀。
5. $500\times g$ 离心5分钟使介质沉降，仔细将上清（即为洗涤组分）移出并用SDS-PAGE检测。
6. 重复步骤4和5两次，共漂洗3次。
7. 每毫升Glutathione Sepharose介质加入0.5毫升洗脱缓冲液，室温孵育5-10分钟，温和振荡以便将介质上结合的蛋白洗脱。
8. $500\times g$ 离心5分钟使介质沉降，仔细将上清（即洗脱得到的蛋白）移至新的管中。
9. 重复步骤7和8两次，分别检测三次洗脱得到的蛋白并选取那些含有蛋白的洗脱产物。

使用Glutathione Sepharose HP、Glutathione Sepharose 4 FF或Glutathione Sepharose 4B纯化柱纯化GST标签蛋白

开始本步骤之前请参考第114页的基本要求。

准备样品

- 1. 裂解细胞
- 2. 将细胞裂解物于4° C高速离心10分钟，并经0.45 μ m滤膜过滤后再使用Glutathione Sepharose介质。若样品特别粘稠可用结合缓冲液稀释、增加裂解处理（超声或匀浆）或用DNase或RNase处理。

准备缓冲液

 应使用高纯度的水和化学药品配置溶液，所有溶液在使用前都须经0.45 μ m滤膜过滤。
结合缓冲液：PBS（140mM 氯化钠，2.7mM 氯化钾，10mM 磷酸氢二钠，1.8mM 磷酸二氢钾），pH 7.3

洗脱缓冲液：50mM Tris-HCl，10mM还原型谷胱甘肽，pH 8.0

 为增加纯度可在结合缓冲液和洗脱缓冲液中加入1-20mM DTT，但这样可能会降低产量。

装柱

Glutathione Sepharose介质溶胀储存在20%的乙醇中。由于每种介质的性质不同，其装柱的步骤也不尽相同，分别介绍如下。

Glutathione Sepharose High Performance装柱

参考附录4中关于装柱的基本指导，Glutathione Sepharose High Performance推荐的实验室规模用柱和相应的流速见表18。

表18： Glutathione Sepharose High Performance推荐的实验室规模用柱。

空柱子1	装柱流速（ml/min）		纯化时最大建议流速（ml/min）
	第一步	第二步	
Tricorn 5/20	0.5	1	0.5
Tricorn 5/50	0.5	1	0.5
Tricorn 10/20	2	4	2
Tricorn 10/50	2	4	2
Tricorn 10/100	2	4	2
XK16/20	5	9	5
XK26/20	13	27	13

1 柱子内径，最大柱床体积，柱床高度请参见目录，《Biodirectory》或网站。

1. 将所有材料的温度平衡至纯化所需的温度。
2. 将介质中约20%的乙醇替换成蒸馏水，使最终沉积的介质与蒸馏水的体积比为75%: 25%。
3. 装柱（如果需要安装装柱池）
4. 用蒸馏水冲走底端和适配器里的空气。确认在柱管内没有气泡。关掉柱子出口，使柱管浸没在水中。
5. 重悬介质，将获得的悬浊液连续倒入柱子中。将悬浊液沿着靠着柱管壁的玻璃棒倒下可以使引入的气泡尽量减少。
6. 如果使用装柱池，迅速将柱子其它空白处和装柱池充满水，把适配器或装柱池的盖子装上，然后将柱子连接到泵上，避免在适配器或入水管中残存气泡。
7. 打开柱子底部出口，将泵设置为所需流速。



理想情况下，Sephacoe High Performance柱材通过两步填装在XK或Tricon柱子中：在第一步不要超过1.0bar（0.1MPa），在第二步不要超过3.5bar（0.35MPa）。如果填装仪器不包括压力指示器，在第一步用5ml/min的流速（XK16/20）或2ml/min的流速（Tricon 10/100柱子），在第二步用9ml/min（XK16/20）或3.6ml/min（Tricon 10/100柱子）的流速。如果不能达到建议的流速，使用泵所能及的最大流速，这也会提供一个填装完好的柱床。



在随后的层析过程中，流速不要超过装柱流速的75%。

8. 保持装柱流速至少3个柱体积，直到达到一个稳定不变的柱床高度。在柱上标记柱床高度。
9. 关闭泵，关闭柱子出口。
10. 如果使用装柱池，解开装柱池，并把适配器装到柱子上。
11. 解开适配器入口，将适配器推进柱子，直到达到标记处。用装柱溶液冲洗适配器入口，锁定适配器位置。
12. 把柱子连接到泵或者层析系统上，并开始平衡。如果需要，重新调整适配器。

Glutathione Sepharose 4 Fast Flow装柱

大体的装柱指南请参照附录4。

建议使用的柱子：

- Tricon 10/100 (直径10毫米) 柱床体积最多8.5毫升，最高10.8厘米。
- XK 16/20（直径16毫米）柱床体积最多30毫升，最高15厘米。
- XK 26/20（直径26毫米）柱床体积最多80毫升，最高15厘米。

1. 将所有材料的温度平衡至纯化所需的温度。
2. 将介质中约20%的乙醇替换成蒸馏水，使最终沉积的介质与蒸馏水的体积比为75%: 25%。
3. 装柱（如果需要，安装装柱池）
4. 用蒸馏水冲走底端和适配器里的空气。确认在柱管内没有气泡。关掉柱子出口，使柱管浸没在水中。
5. 重悬介质，将获得的悬浊液连续倒入柱子中。将悬浊液沿着靠着柱管壁的玻璃棒倒下可以

使引入的气泡尽量减少。

6. 如果使用装柱池，迅速的将柱子其它空白处和装柱池充满水，把适配器或装柱池的盖子装上，然后将柱子连接到泵上，避免在适配器或入水管中残存气泡。
7. 打开柱子底部出口，将泵设置为所需流速。
8. 保持装柱流速至少3个柱体积，直到达到一个稳定不变的柱床高度。在柱上标记柱床高度。



理想情况下，Fast Flow柱材通过恒定的不超过1bar (0.1MPa) 的压力填装在XK柱管中，如果填装仪器不包括压力指示器，使用15ml/min，450cm/h的流速（XK16/20柱子）或6ml/min，450cm/h的流速（Tricon 10/100柱子）。如果不能达到建议的流速，使用泵所能及的最大流速，这也会提供一个填装完好的柱床。



在随后的层析过程中，流速不要超过装柱流速的75%。

9. 关闭泵，关闭柱子出口。
10. 如果使用装柱池，解开装柱池，并把适配器装到柱子上。
11. 解开适配器入口，将适配器推进柱子，直到达到标记处。用装柱溶液冲洗适配器入口，锁定适配器位置。
12. 把柱子连接到泵或者层析系统上，并开始平衡。如果需要，重新调整适配器。

Glutathione Sepharose 4 B装柱

大体的装柱指南请参照附录4。

建议使用的柱子：

- Tricon 10/100 (直径10毫米) 柱床体积最多8.5毫升，最高10.8厘米。
 - XK16/20 (直径16毫米) 柱床体积最多30毫升，最高15厘米。
 - XK26/20 (直径26毫米) 柱床体积最多80毫升，最高15厘米。
1. 将所有材料的温度平衡至纯化所需的温度。
 2. 将介质中约20%的乙醇替换成蒸馏水，使最终沉积的介质与蒸馏水的体积比为75%: 25%。
 3. 装柱（如果需要安装装柱池）
 4. 用蒸馏水冲走底端和适配器里的空气。确认在柱管内没有气泡。关掉柱子出口，使柱管浸没在水中。
 5. 重悬介质，将获得的悬浊液连续倒入柱子中。将悬浊液沿着靠着柱管壁的玻璃棒倒下可以使引入的气泡尽量减少。
 6. 如果使用装柱池，迅速将柱子其它空白处和装柱池充满水，把适配器或装柱池的盖子装上，然后将柱子连接到泵上，避免在适配器或入水管中残存气泡。
 7. 打开柱子底部出口，把泵设置为所需流速。
 8. 保持装柱流速至少3个柱体积，直到达到一个稳定不变的柱床高度。在柱上标记柱床高度。



理想情况下，4B 柱材通过恒定的不超过1bar (0.1MPa) 的压力填装在XK柱管中，如果填装仪器不包括压力指示器，使用2.5ml/min，75cm/h的流速（XK16/20柱子）或1ml/min，75cm/h的流速（Tricon 10/100柱子）。如果不能达到建议的流速，使用泵所能及的最大

流速，这也会提供一个填装完好的柱床。



在随后的层析过程中，流速不要超过装柱流速的75%。

9. 关闭泵，关闭柱子出口。
10. 如果使用装柱池，解开装柱池，并把适配器装到柱子上。
11. 解开适配器入口，将适配器推进柱子，直到达到标记处。用装柱溶液冲洗适配器入口，锁定适配器位置。
12. 把柱子连接到泵或者层析系统上，并开始平衡。如果需要，重新调整适配器。

使用柱子纯化

1. 用大概5个柱体积的结合缓冲液平衡柱子。
2. 加入预处理后的样品。
3. 用5到10个柱体积的结合缓冲液洗柱或直到在穿透中没有物质流出。保存穿透用于SDS-PAGE分析来分析介质的结合效率。
4. 用5到10个柱体积的洗脱缓冲液洗脱。收集组分，分别检测纯化的蛋白。将含有GST标签的目的蛋白组分合并。

使用GST MultiTrap FF和GST MultiTrap 4B 96孔过滤板进行高通量筛选

GST MultiTrap FF和GST MultiTrap 4B是预装好的，供一次性使用的96孔过滤板，用来进行可重复的，高通量筛选GST标签蛋白。典型的应用包括表达筛选不同的载体构建，筛选蛋白可溶性、优化小规模平行纯化的条件。这些过滤板使纯化筛选变得简单，每孔最多可富集0.5mg GST标签蛋白。细胞完全破碎后，可以将最多600 μ l的未净化细胞裂解物不经过离心或过滤样品的步骤而直接上样到96孔过滤板的孔中。如果样品在裂解后过于粘稠，建议延长机械/化学裂解样品的时间；或者，加入核酸酶降解核酸。GST标签的蛋白在温和的非变性条件下洗脱，能够保持蛋白功能和抗原活性。

板子分别预装了Glutathione Sepharose 4 Fast Flow（4%高度交联的琼脂糖珠）和Glutathione Sepharose 4B（4%琼脂糖珠）。每孔含有500 μ l 10%Glutathione Sepharose 4 Fast Flow和Glutathione Sepharose 4B的悬浊液。柱材保存在储存溶液中（50 μ l柱材保存在20%的乙醇中）。注意，结合能力取决于流速和蛋白。

96孔过滤板含有800 μ l体积的孔，是由聚丙烯和聚乙烯组成。GST MultiTrap FF和GST MultiTrap 4B的性质见附录2。

预装的GST MultiTrap FF和GST MultiTrap 4B在孔与孔之间和板与板之间能够给出高度的可重复性，产量和纯度的可重复性都很高。可以采用离心或真空的方式由自动的机器人系统或者手动处理。因为Glutathione Sepharose以预装的大包装形式提供：GSTrap FF，GSTrap 4B（1ml和5ml柱）和GSTPrep FF16/10（20ml柱），纯化方案可以简单的放大。这些产品的讨论详见本章后文。



图53：GST MultiTrap FF和GST MultiTrap 4B 96孔过滤板。

样品制备

在开始这个过程前需要考虑的问题，参照112页。

- 用商品化的试剂盒裂解会造成大的细胞碎片颗粒，在纯化过程中可能会干扰孔的排干。这一问题可以通过在上样前离心或者过滤样品来解决。
- 如果细胞破碎完全，可以把未净化的裂解物直接上样到孔中，而不用预离心或过滤样品。把未净化的裂解物在制备后马上加入孔中，因为裂解物如果不立即使用或者在使用

前冷冻会沉淀。对样品的再次裂解能防止在上样时堵住孔。



如果样品过于粘稠，需要额外的延长用机械力处理样品的时间以确认样品达到完全裂解（把样品置于冰上避免过热）。

准备缓冲液



使用高纯的水和化学药品，在使用前用0.45 μm的滤膜过滤。

结合缓冲液：PBS（140mM 氯化钠，2.7mM 氯化钾，10mM 磷酸氢二钠，1.8 mM 磷酸二氢钾），pH7.3

洗脱缓冲液：50mM Tris-HCl，10mM还原型谷胱甘肽，pH8.0



在结合和洗脱缓冲液中可以加入1-20mM DTT，但这可能导致GST标签蛋白产量降低。

高通量筛选的离心方法

准备过滤板

1. 剥掉96孔过滤板底部的封膜。把过滤板放在一个容器中，用来容纳剥掉封膜时漏出的保存溶液。
2. 把过滤板顶部朝下，轻柔振动，以使附着在顶部封膜上的介质脱离。把过滤板放回顶部朝上的位置。
3. 将过滤板紧靠操作台，剥掉过滤板顶部的封膜。
注：如果有1个或几个孔中的介质干了，加入缓冲液重新润湿。介质的性能不会受到影响。
4. 将过滤板放在收集板的上面。
注：在以下的步骤中，根据需要更换或者清空收集板。
5. 将过滤板500×g离心2分钟，除去介质乙醇保存溶液。
6. 每孔加入500 μl去离子水，500×g离心2分钟。
7. 每孔加入500 μl结合缓冲液，500×g离心2分钟。重复一次，过滤板即可使用。

离心方法

在离心过程中不要用超过700×g的转速。

1. 将未净化或已净化的裂解物（每孔最多600 μl）上样到过滤板的孔中，温浴3分钟。
注：如果蛋白产量过低，增加温浴时间或温和振荡过滤板，以充分混合。
2. 将过滤板用100×g离心4分钟，或直到所有的孔都排空，弃去流出液。
3. 每孔加入500 μl结合缓冲液用以洗去未结合的样品。500×g离心2分钟。重复一次，或直到所有未结合的样品都被除去。
注：为了获得高纯度，此步收集的样品在280nm的紫外吸收需小于0.1。如果必要，更换每次洗脱收集板来阻止目的蛋白的稀释。

4. 每孔加入200 μ l的洗脱缓冲液，混合1分钟。

注：洗脱缓冲液的体积可以变化（每孔50-100 μ l），这取决于所需目的蛋白的浓度。

5. 更换收集板，500 $\times$ g离心2分钟收集洗脱的蛋白。重复两次或直到没有目的蛋白被洗脱下来。



如果洗脱蛋白的产量低，可以增加温育时间。

用真空抽滤方法来进行高通量筛选

在开始这个过程前需要考虑的问题，参照112页。



如果使用真空抽滤方法时，一直存在发泡或在收集板中有气泡，就应该考虑采用离心方法。过滤板和收集板之间的距离非常关键，如果有必要，则调整该距离。

准备过滤板

1. 剥掉96孔过滤板底部的封膜。把过滤板放在一个容器中，用来容纳剥掉封膜时漏出的保存溶液。
2. 把过滤板顶部朝下，轻柔振动，以使附着在顶部封膜上的介质脱离。把过滤板放回顶部朝上的位置。
3. 将过滤板紧靠操作台，剥掉过滤板顶部的封膜。

注：如果有1个或几个孔中的介质干了，加入缓冲液重新润湿。介质的性能不会受到影响。

4. 将过滤板放在收集板的上面。

注：在以下的步骤中，根据需要更换或者清空收集板。

5. 将真空度设为-0.15bar。把96孔板和收集板放在真空套管上，用以从柱材中除去乙醇保存溶液。
6. 每孔加入500 μ l去离子水。加真空，从孔中排干水。
7. 每孔加入500 μ l结合缓冲液，用来平衡柱材。如步骤5一样除去溶液，重复一次。过滤板即可使用。

真空抽滤方法



如果使用机器人系统，真空必须根据系统来调整。



在真空操作中，不要使压力超过-0.5bar。

1. 将未净化或已净化的裂解物（每孔最多600 μ l）上样到过滤板的孔中，温浴3分钟。

注：如果蛋白产量过低，增加温浴时间或温柔振动过滤板，以充分混合。

2. 通过施加-0.15bar的真空度除去流出物，直到所有的孔都排空为止。缓慢的增加真空度到-0.30bar，大概5秒钟后关掉真空泵，弃去流出物。



过快地增加真空度会造成在过滤板底部发泡，进而造成样品的交叉污染。

3. 每孔加入500 μ l结合缓冲液用以洗涤掉未结合的样品。像步骤2一样施加-0.15bar的真空度，重复一次或直到所有未结合的样品都被洗掉。

注：为了获得高纯度，此步收集的样品在280nm的紫外吸收需小于0.1。如果必要，更换每次洗脱收集板来阻止目的蛋白的稀释。

4. 每孔加入200 μ l的洗脱缓冲液，混合1分钟。

注：洗脱缓冲液的体积可以变化（每孔50-100 μ l），这取决于所需目的蛋白的浓度。

5. 更换收集板，施加-0.15bar的真空度收集被洗脱蛋白。重复两次或者直到没有目的蛋白被洗脱为止。



如果洗脱蛋白的产量低，可以增加温育时间。

应用案例

用GST MultiTrap FF高通量筛选和纯化GST-hippocalcin

GST MultiTrap FF和GST MultiTrap 4B可以进行可重复的高通量筛选快速平行纯化GST标签蛋白，该过程可以使用机器人系统、离心或手动真空方法。在本例中，用于纯化GST-hippocalcin的结合缓冲液的条件使用GST MultiTrap FF优化。基于缓冲液、pH值、氯化钠、甘油、DTT和谷胱甘肽的参数，设计了筛选用于纯化的结合缓冲液的研究。同时也进行了一个超声和使用商品化细胞裂解试剂盒的比较研究。因子设计（实验设计）和统计分析使用MODDE软件（Umetrics）。不同的缓冲液条件和样品制备方法随机的分布在过滤板上。

在样品和结合缓冲液（也用作洗涤缓冲液）中存在的谷胱甘肽能够显著降低纯化的GST-hippocalcin的产量。然而所用的缓冲液类型对产量没有影响。低pH值能增加产量，高pH降低产量。改变pH对蛋白的纯度没有明显的影响（图54）。诸如DTT、甘油、氯化钠等添加剂对该蛋白的产量和纯度没有明显影响。

筛选结果显示纯化GST-hippocalcin能够获得最高产量和纯度的最优缓冲液条件是：10-20mM 磷酸钠，140-400mM 氯化钠，pH6.2到7.0（数据未展示）。在本例中，结果显示商品化的细胞裂解试剂盒和超声都可以用来裂解大肠杆菌而并未显著影响纯化结果。

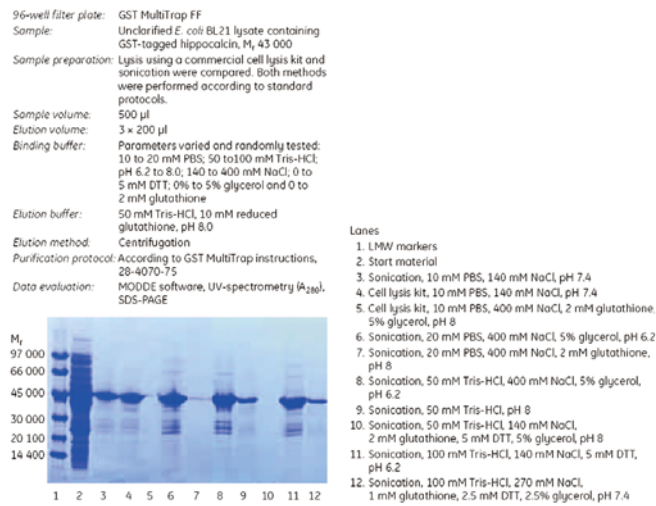


图54：还原条件下的SDS-PAGE分析。ExcelGel SDS Gradient 8-18。从GST MultiTrap FF过滤板上某些孔洗脱的GST-hippocalcin的收集组分。考马斯亮蓝染色。

用GST SpinTrap纯化模块进行小量制备

GST SpinTrap纯化模块适用于筛选小量多种细菌裂解物和对表达纯化的优化过程中检测样品。每个模块包含足够50次使用的纯化试剂，使用预装Glutathione Sepharose 4B的SpinTrap柱。样品上样、洗涤、洗脱都可以用标准的小型离心机完成。

用离心机使用GST SpinTrap柱进行多个样品的纯化

在开始这个过程前需要考虑的问题，参照112页。

每根SpinTrap柱含有50 μ l Glutathione Sepharose 4B介质，足够纯化最多400 μ g的重组GST蛋白。每次的上样量不要超过600 μ l。这个过程可以适用于从2-12ml的培养物中制备的裂解物。

GST SpinTrap纯化模块的组分

10 $\times$ PBS: 1.4M 氯化钠，27mM 氯化钾，100mM 磷酸氢二钠，18 mM 磷酸二氢钾，pH7.3

如果准备1 $\times$ PBS溶液，用水稀释10 $\times$ PBS，4 $^{\circ}$ C保存。

还原型谷胱甘肽0.154g。如果准备洗脱缓冲液，将模块附带的50ml稀释缓冲液全部倒入含有还原型谷胱甘肽的瓶子，摇动直到完全溶解。分装成1-20ml保存在-20 $^{\circ}$ C。

稀释缓冲液: 50mM Tris-HCl, pH 8.0

SpinTrap柱: 50个单位

纯化步骤

1. 轻柔地反复颠倒并振动柱子以重悬Glutathione Sepharose 4B介质。
2. 通过将上盖旋转四分之一圈以使其变松，打开底部盖子。
3. 将柱子放在干净的1.5ml或2ml的离心管中，用735 $\times$ g的速度离心1分钟。
4. 除去每个离心管中的缓冲液，装回底部盖子，打开顶盖。
5. 向柱子中加入至多600 μ l制备好多的样品。
6. 把每根柱子重新盖上，在室温温育5-10分钟，温柔地颠倒混匀。
7. 除去顶盖和底盖，把每根柱子放到一个干净的标记好的1.5ml或2ml离心管中。
8. 用735 $\times$ g的转速离心1分钟，收集穿透。
9. 把每根柱子放到一个干净的标记好的1.5ml或2ml离心管中。
10. 向每根柱子加入600 μ l的1 $\times$ PBS洗涤缓冲液，重复离心步骤。如果需要，用600 μ l的1 $\times$ PBS洗涤缓冲液额外洗涤一次。
11. 向每根柱子加入100-200 μ l洗脱缓冲液。重新盖上顶盖和底盖，在室温温育并温柔晃动。
12. 除去顶盖和底盖，将每根柱子放到一个干净的标记好的1.5ml或2ml离心管中。
13. 把所有的柱子再次离心，收集洗脱物。保存洗脱产物用作电泳。



标签蛋白的产量可以通过重复洗涤步骤两到三次然后合并洗脱物的方法来提高。

用GSTrap HP, GSTrap FF和GSTrap 4B柱子纯化

GSTrap是特别设计的1ml和5ml预装了GSTrap HP, GSTrap FF和GSTrap 4B介质的预装柱。选择指南请参照表16, 每种柱子的主要特性请参照附录2。

样品上样、洗涤、洗脱都可以用注射器和附带的接头、蠕动泵或诸如ÄKTAdesign一样的液相层析系统完成(仪器选择请参照表8)。对于简单的规模化放大, 二到三根柱子可以串联在一起使用, 简单的把一根柱子的末端旋入另一根柱子的顶端即可。

图55显示了用GSTrap柱子进行成功纯化的简单步骤。



图55: GSTrap HP, GSTrap FF和GSTrap 4B 1ml和5ml柱子可以简单方便的一步纯化GST标签蛋白。GST标签蛋白的简单纯化在右侧显示。

GSTrap HP, FF和4B 柱子的柱管由聚丙烯制成, 具有生物兼容性并且不与生物分子发生相互作用。顶端和底端由多孔的聚乙烯烧结而成。柱子在运输时入口被塞子堵住, 而出口是被封死的, 但可以掰断。每个包装都含有所有用于把柱子连接到不同仪器上的必需配件。注意, GSTrap柱子不能打开或者再次填装。

GSTrap柱子和存在的用于纯化GST标签蛋白的方案兼容, 包括柱上蛋白酶切方法。如果需要除掉GST标签, 有标签蛋白可以在仍旧结合在柱子上时用适当的位点特异性蛋白酶酶切, 或者在洗脱后酶切(稍后见本章)。柱上酶切省掉了多余的用于分离GST蛋白和酶切后的目的蛋白的步骤, 因为GST蛋白仍旧结合在柱子上。对于快速的规模化放大, 两或三根柱子(1ml或5ml)可以串联使用(有可能增加柱压)。

三种介质中的 Glutathione Sepharose 4 Fast Flow 也以预装的20ml GSTprep FF 16/10柱提供(见134页)。所有这三种介质都以实验室自装(从25ml到500ml不等)形式提供, 以便使用者根据自己的选择装柱。

关于清洗、储存、操作柱子的信息请参见附录2。

介质非常稳定, 并且纯化过程具有可重复性。这可以从一个实验中看出。该实验中, 含有GST-hippocacin(分子量43000)的大肠杆菌裂解物在同一根柱子上反复纯化10次, 每次纯化之间未进行柱子的清洗。10次重叠的色谱图(图56A)重叠的非常的好, 显示在结合能力和柱子的稳定性上有很小或没有变化。SDS-PAGE分析(图56B)显示10个运行后, 纯度和结合能力没有变化。

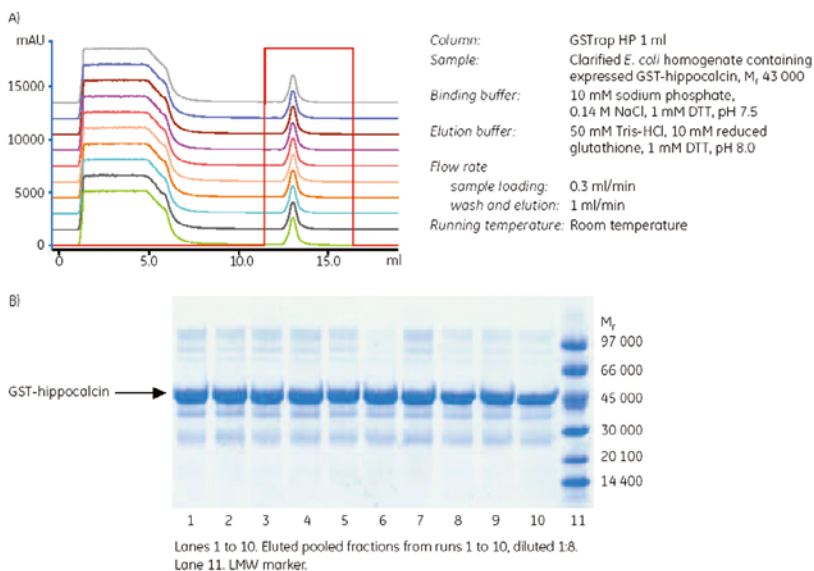


图56: (A) 确认预装的1mlGlutathione Sepharose 4 High Performance柱子的稳定性。10次重复的纯化色谱图重叠比较。(B) 对每次重复性纯化选取合并组分的非还原SDS-PAGE (ExcelGel SDS Gradient 8-18), 考马斯亮蓝染色。

样品制备

通用的样品制备过程请参照26页。

- 样品应该在上柱前一刻被离心或者用0.22或0.45 μ m滤膜过滤。如果样品过于粘稠, 用结合缓冲液稀释或用HiTrap Desalting, PD-10 Desalting 或 HiPrep 26/10 Desalting 脱盐柱更换缓冲液以避免堵塞柱子。

准备缓冲液

- 使用高纯的水和化学药品, 在使用前用0.45 μ m的滤膜过滤

结合缓冲液: PBS (140mM 氯化钠, 2.7mM 氯化钾, 10mM 磷酸氢二钠, 1.8 mM 磷酸二氢钾), pH7.3

洗脱缓冲液: 50mM Tris-HCl, 10-20mM还原型谷胱甘肽, pH8.0

- 在结合和洗脱缓冲液中可以加入1-20mM DTT来提高纯度。但这可能导致GST标签蛋白的产量较低。

纯化

1. 用蒸馏水充满注射器，移除塞子，把柱子用提供的Luer接头连接到注射器上，保持接头处有液体，避免向柱子中引入气泡。如果在柱子中发现有气泡，用蒸馏水冲洗，直到气泡消失。
 2. 掰掉底部封口，用5毫升蒸馏水洗涤柱子。
 3. 用5个柱体积的结合缓冲液平衡柱子。
 4. 用注射器或者蠕动泵加入预处理的样品，为了获得最好的结果，在上样时，用0.2-1ml/min（1ml柱子）和0.5-5ml/min（5ml柱子）的流速。
 5. 用结合缓冲液洗涤至少5到10个柱体积，直到吸收达到平稳的基线或在流出物中没有物质流出。在洗涤的过程中保持流速为1-2ml/min（1ml柱子）和5-10ml/min（5ml柱子）。
备选方案：收集穿透（1ml柱子收集为每管1ml，5ml柱子收集为每管2ml），保留这些穿透直到这个过程成功结束。保留样品以供SDS-PAGE分析或CDNB活力检测，用来衡量蛋白和柱材的结合效率。
 6. 用洗脱缓冲液洗5到10个柱体积。保持0.2-1ml/min（1ml柱子）和0.5-5ml/min（5ml柱子）的流速洗脱。
 7. 洗脱后，用3到5倍柱体积的结合缓冲液再生柱子。此后，柱子可以即可用作新的纯化。
- 当使用注射器时，1ml/min对应于大概每分钟30滴（HitTrap 1ml柱子），5ml/min对应于大概每分钟120滴（HiTrap 5ml柱子）。



图57：用注射器来操作GSTrap。（A）准备缓冲液和样品。除掉柱子的顶盖，掰掉底部封口。（B）将样品上柱并收集组分。（C）洗涤和洗脱，继续收集组分。

用于洗脱的体积和时间对不同标签蛋白有所不同。有时，需要额外高浓度的谷胱甘肽来洗脱。柱子的穿透、洗涤和洗脱物质应该用SDS-PAGE监测，必要时，需要联合Western blotting使用。



流速可能影响GST标签蛋白与柱子的结合和洗脱，由于GST与谷胱甘肽的结合较慢，保持低流速对于获得最大的结合能力是重要的。蛋白性质、pH值和温度是其它可能影响结合的因素。然而，当操作敏感蛋白时，建议使用高流速来降低纯化时间。将两到三根柱子并联使用可以增加样品通过柱子的停留时间，以便使用更高的流速。



GSTrap HP，GSTrap FF和GSTrap 4B柱子的再次使用决定于样品的性质，应该仅用于纯化相同的蛋白以避免交叉污染。

应用案例

1. 用1ml和5ml GSTrap HP柱高性能纯化GST-hippocalcin蛋白。

Glutathione Sepharose High Performance非常适合一步纯化GST标签蛋白。下面的数据显示用1ml和5ml GSTrap柱进行实验的结果。

在这项研究中，含有GST-hippocalcin的5ml和25ml大肠杆菌匀浆物分别上样到1ml和5ml柱子中。

图58A到B显示了从两次纯化所得的色谱图。经计算，洗脱峰中的蛋白分别为6.5mg和39.7mg。

用SDS-PAGE胶在非还原和还原条件下分析GST-hippocalcin蛋白（图58C）。每孔上样10 μg蛋白。SDS-PAGE也显示了游离GST的表达。还原剂的存在导致高分子量条带的消失，这个条带可能对应着由于游离巯基氧化而导致的GST蛋白的聚集。

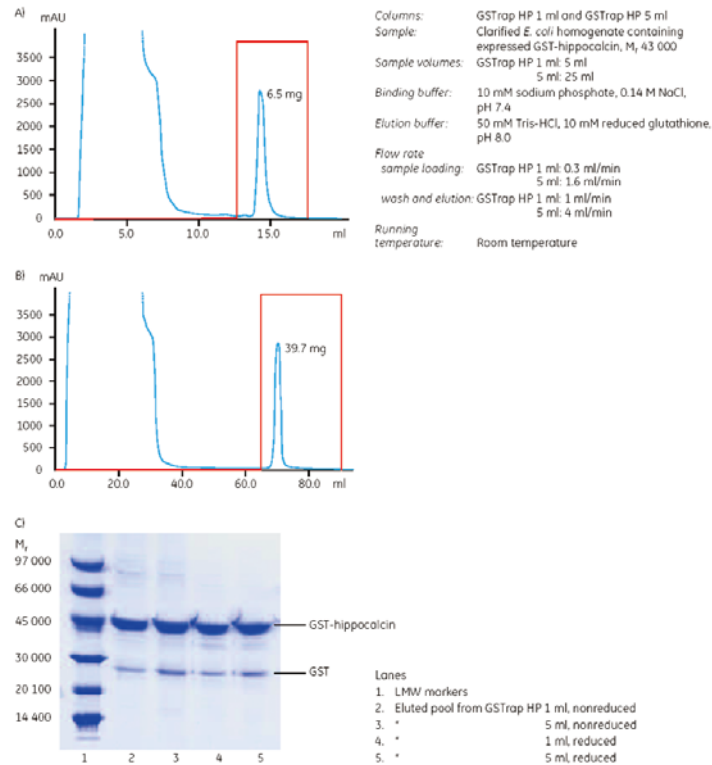


图58: 从(A) 1ml GSTrap HP到(B) 5ml GSTrap HP柱的规模化放大。(C) 考马斯亮蓝染色的还原条件下和非还原条件下的SDS-PAGE (ExcelGel SDS Gradient 8-18)。分析的样品为图58A和B中纯化所得的组分。

2. 用1ml和5ml GSTrap FF柱快速纯化GST标签蛋白

一个GST蛋白分别用1ml和5ml GSTrap FF柱从8ml和40ml净化的细胞裂解物中纯化出来。样品上

样到预先用PBS（pH7.3）平衡的柱子中。用10个柱体积的PBS洗涤柱子之后，GST标签蛋白用还原型谷胱甘肽洗脱（图59）。每次运行用AKTAexplorer10耗费25分钟的时间完成。SDS-PAGE分析显示分离的高纯GST标签蛋白（结果未显示）。1ml和5ml GSTrap FF柱的有标签蛋白的产量分别为2.7mg和13.4mg。

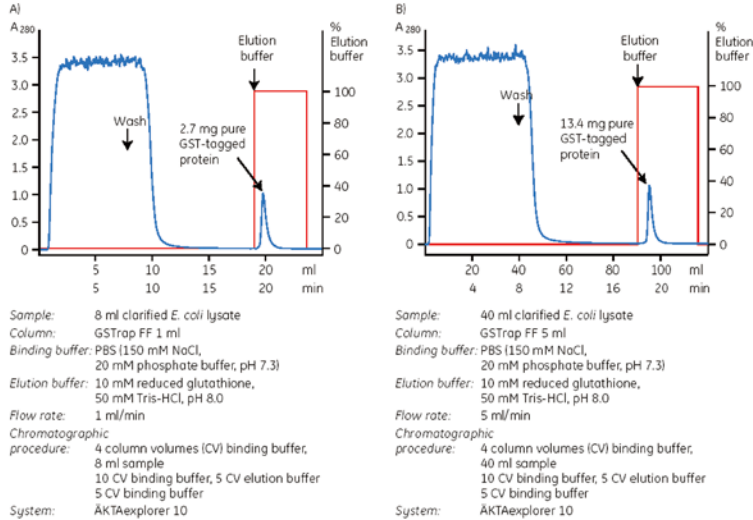


图59：在AKTAexplorer10上用1ml和5mlGSTrap FF柱纯化GST标签蛋白。表达有GST标签蛋白的8ml和40ml大肠杆菌细胞裂解物分别上样到1ml（A）和5ml（B）GSTrap FF柱上。

3. 用ÄKTAexpress两步自动纯化

在ÄKTAexpress上从净化的大肠杆菌裂解物进行了两步自动纯化GST-hippocalcin蛋白。一根GSTrap 4B 1ml柱用于第一步亲和层析，一根HiLoad 16/60 200 pg用于进一步用凝胶过滤层析纯化。

在样品和缓冲液中都含有还原剂（DTT）。ÄKTAexpress能够自动把从亲和层析步骤（GSTrap 4B）洗脱下来的目的蛋白组分上样到凝胶过滤层析柱上。含有GST-hippocalcin蛋白的大肠杆菌裂解物先由酶消化裂解然后用超声破碎。裂解物通过离心和过滤净化。5ml净化后的裂解物上样到一根GSTrap 4B 1ml柱上。两步自动纯化的色谱图和含有目的蛋白的洗脱组分的SDS-PAGE结果显示在图60。凝胶过滤层析后获得两个峰：一个小峰和一个大峰。根据SDS-PAGE（只显示了大峰组分的结果，图60B），两个峰都含有GST-hippocalcin。从评估凝胶过滤层析的结果来看，大峰看起来是GST-hippocalcin的二聚体。小峰可能是GST-hippocalcin更大的聚合体。GST-hippocalcin的纯度很高（图60C）。

通过UNICORN软件计算280nm的吸光度得到洗脱的GST-hippocalcin蛋白的产量是6.4mg。

这个应用显示了两步纯化对提高GST-hippocalcin蛋白的纯度有好处。

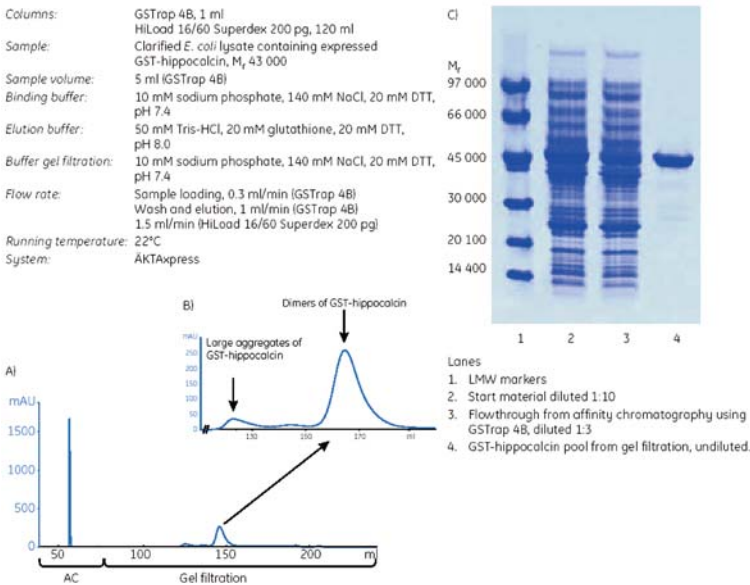


图60：（A）在ÄKTAexpress上用自动的两步纯化从大肠杆菌裂解物中纯化GST-hippocalcin蛋白。

（B）凝胶过滤层析峰图的放大图显示纯化的GST-hippocalcin蛋白形成了高分子量聚合体和二聚体。（C）SDS-PAGE（ExcelGel SDS Gradient8-18%）显示最后纯化所得的GST-hippocalcin的纯度（第4道）。

在ÄKTAexpress plus上用GSTrap 1ml柱纯化GST标签蛋白

在开始这个过程前需要考虑的问题，参照112页。



这一过程使用GSTrap 1ml柱，但同样适用于GSTrap HP或GSTrap 4B 1ml柱。

样品制备



样品应该在上柱前一刻被离心或者用0.22或0.45μm滤膜过滤。如果样品过于粘稠，用结合缓冲液稀释或用HiTrap Desalting, PD-10 Desalting 或 HiPrep 26/10 Desalting 脱盐柱更换缓冲液以避免堵塞柱子。

准备缓冲液



使用高纯的水和化学药品，在使用前用0.45μm的滤膜过滤

结合缓冲液（A1端口）：20mM PBS，0.15M 氯化钠，pH7.3

洗脱缓冲液：50mM Tris-HCl，10mM还原型谷胱甘肽，pH8.0

准备至少500毫升洗脱缓冲液。



在结合和洗脱缓冲液中可以加入1-20mM DTT来提高纯度。但这可能导致GST标签蛋白的产量降低。

系统准备



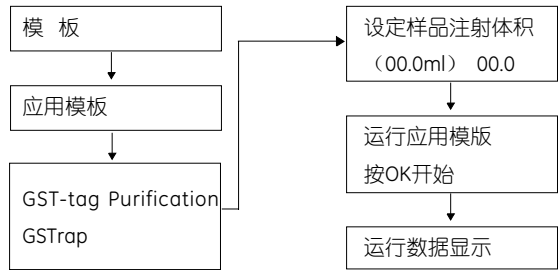
一旦系统准备好了，其余的步骤（从选择应用模版菜单中运行方法）就会自动进行。

1. 将连接至A端口（8孔阀）的每个注入管放于结合缓冲液中，把连接至B端口（2孔阀）的注入管放于洗脱缓冲液中。
2. 将三根棕色的废液管放于废液缸中。
3. 将柱子连接至上样阀（7孔阀）的端口1和UV流动池之间。
4. 用18毫米的管子填充部分收集器，将收集臂的白板紧靠在第一管外侧。
5. 在上样阀的2号和6号端口间连接上样环，上样环的体积和样品相比要足够大。用注射器手动填装上样环。

注：如果使用Superloop，额外还需要参照Superloop附带的说明书。

选择应用模版，开始运行逐步洗脱方法

1. 检查到primeview的通信，在屏幕的右下角应该显示：“controlled by prime”。
2. 用箭头和OK按钮移动菜单树，直到找到“GST-tag purification GSTrap”。



3. 输入样品体积，按OK键运行模板。

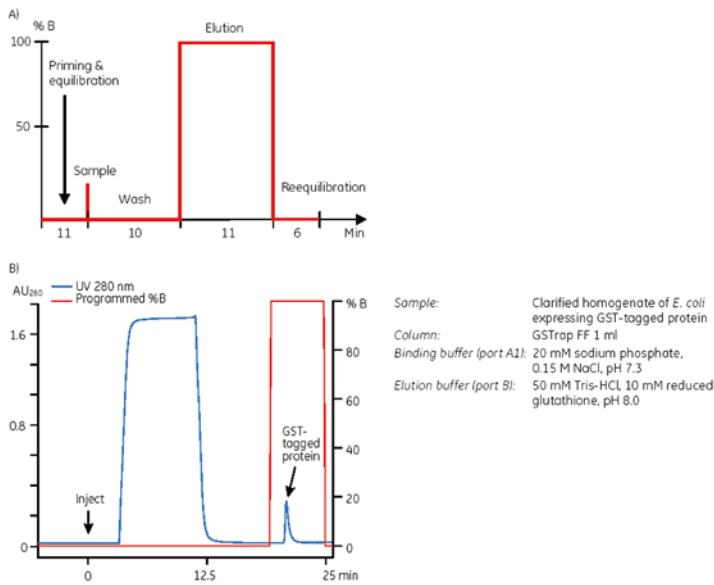


图61：（A）使用GST-tag purification GSTrap模版的理论梯度。总共的分离时间：37分钟+样品上样时间。（B）纯化GST标签蛋白的典型结果。

用GSTPrep FF 16/10柱进行制备性纯化

GSTPrep FF 16/10柱基于20ml HiPrep 柱子的设计，可以立即用于简单单步制备性纯化GST标签蛋白、其他谷胱甘肽S-转移酶和谷胱甘肽结合蛋白。该柱子预装了 Glutathione Sepharose 4 Fast Flow，显示了高结合能力和优良的流速性能。柱子可以串联使用以便简单的规模化放大。



图62：GSTPrep FF 16/10柱。

柱子由聚丙烯制成，具有生物兼容性且不与生物分子发生相互作用。分离可以用诸如 ÄKTA design 之类的层析系统简单完成。纯化设备的选择指南参见表8，GSTPrep FF的参数参见附录2。

Glutathione Sepharose 4 Fast Flow也以预装的1ml和5ml GSTrap FF柱、预装的96孔过滤板、GST Multitrap FF以及实验室自装批量纯化所用柱材包装（25ml、100ml、500ml）的形式提供。注意，GSTPrep柱不能打开或重装。

样品制备

通用的样品制备过程请参照26页。



样品应该在上柱前一刻被离心或者用0.22或0.45 μ m滤膜过滤。如果样品过于粘稠，用结合缓冲液稀释或用HiTrap Desalting，PD-10 Desalting或 HiPrep 26/10 Desalting脱盐柱更换缓冲液以避免堵塞柱子。

准备缓冲液



使用高纯的水和化学药品，在使用前用0.45 μ m的滤膜过滤

结合缓冲液：PBS（140mM 氯化钠，2.7mM 氯化钾，10mM 磷酸氢二钠，1.8 mM 磷酸二氢钾），pH7.3

洗脱缓冲液：50mM Tris-HCl，10mM还原型谷胱甘肽，pH8.0



在结合和洗脱缓冲液中可以加入1-20mM DTT来提高纯度。但这可能导致GST标签蛋白的产量降低。

纯化

1. 将离心或过滤后的样品（在结合缓冲液中）上样到柱子上，使用1-5ml/min（30-150cm/h）的流速。
2. 用100-200ml的结合缓冲液洗柱。流速为2-10ml/min（60-300cm/h）。
3. 用100-200ml洗脱缓冲液洗脱。流速为2-10ml/min（60-300cm/h）。
4. 用60-100ml的结合缓冲液平衡柱子。流速为2-10ml/min（60-300cm/h）。柱子即可用于新的纯化。



由于GST和谷胱甘肽的结合较慢，流速可能影响GST标签蛋白与柱子的结合和洗脱，保持低流速对于获得最大的结合能力十分重要。不同蛋白的结合能力可能不同。因此，如果样品的上样量接近柱子的载量时，不同蛋白之间的产量可能不同。



最好这样做：将穿透保留直到这个过程成功结束。保留样品用SDS-PAGE或CDNB分析来衡量蛋白与柱子结合的效率。



GSTrap HP, GSTrap FF和GSTrap 4B柱子的再使用取决于样品的性质，应该仅用于纯化相同的蛋白以避免交叉污染。

清洗、保存、操作的信息请参见附录2。

应用案例

1. 使用1ml和5mlGSTrap FF以及GSTPrep16/10柱对两个GST标签蛋白进行纯化并规模化放大
Glutathione Sepharose 4 Fast Flow可用于简单的单步纯化GST标签蛋白。图63A到C和图64A到C显示用1ml和5ml GSTrap FF以及GSTPrep16/10柱进行规模化放大纯化的研究。纯化了两个不同的GST标签蛋白：GST-DemA和GST-Pur α 。编码DemA的基因从Streptococcus dysgalactiae中分离得到的，该蛋白是一个纤维蛋白原结合蛋白，具有胞浆蛋白结合性质同时具有和其它Streptococcus种类中M及类M蛋白的序列相似性。Pur α 被发现参与转录调节。

表达GST标签蛋白的大肠杆菌重悬于PBS（140mM 氯化钠，2.7mM 氯化钾，10mM 磷酸氢二钠，1.8 mM 磷酸二氢钾，pH7.4）中（1g/5ml），其中添加了1mM PMSF，1mM DTT，100mM MgCl₂，1U/ml RNase和13U/ml DNase I。细胞用VibracellITM 超声处理器超声裂解3分钟，振幅50%。细胞抽提物在超声的过程中置于冰上。细胞碎片用48000×g转速在4° C离心30分钟。上清在用0.45 μ m的铝膜过滤后上样到柱子上。

下面的纯化过程用AKTAexplorer 100层析系统进行。1ml和5ml GSTrap FF以及GSTPrep16/10柱用5倍柱体积的PBS，pH 7.4平衡后即将准备好的样品上样到柱子上。柱子分别用PBS洗涤10个柱体积（GST-DemA）和20个柱体积（GST-Pur α ）后用7个柱体积 Tris-HCl，pH 8.0，10mM 还原型谷胱甘肽洗脱。洗脱的蛋白纯度用SDS-PAGE分析（见图63D和64D）。

在这项规模化放大研究中，主要的参数是存留时间（比如说样品和柱材接触的时间）。对于1ml和5ml GSTrap FF来说，存留时间是相同的，但是对于20ml GSTPrep16/10柱来说，由于柱子长度和直径的比例，则是5ml GSTrap FF的两倍。GST-DemA和GST-Pur α 蛋白的结合量是不同的，这

是由蛋白依赖的结合性质决定的。由于GST的低转化率效应，有些上样的蛋白发现存在于穿透中。洗脱的GST蛋白量和柱体积及样品上样量成比例增加。

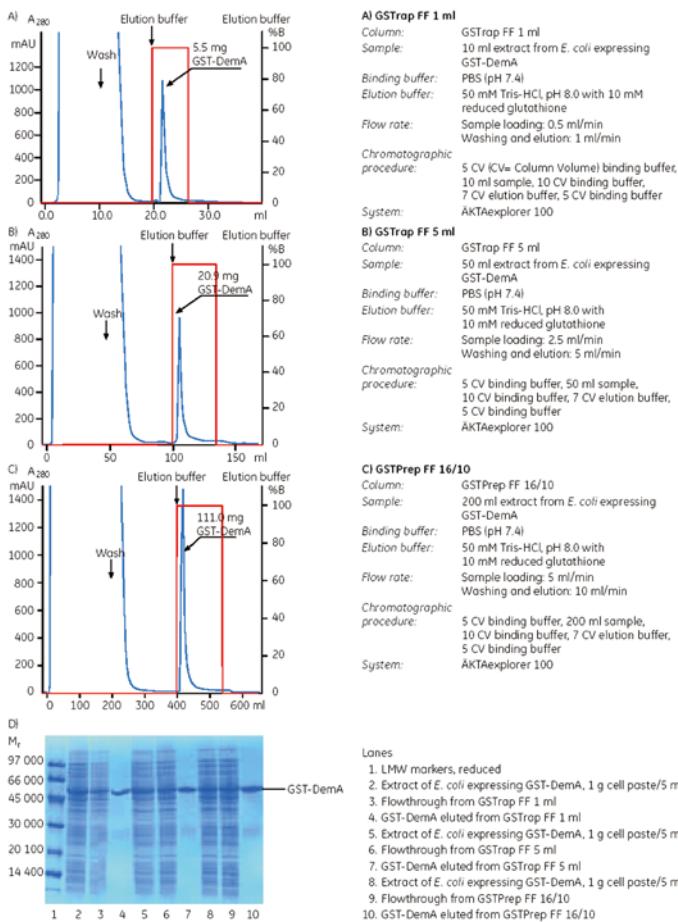
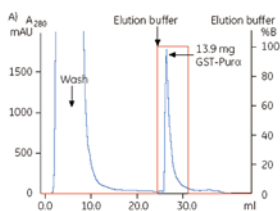


图63: GST-DemA蛋白的纯化和规模化放大 (A) GSTrap FF 1ml, (B) GSTrap FF 5ml, (C) GSTPrep16/10, (D) 用Excel Gel (12.5%均一浓度) 胶的SDS-PAGE分析。采用MultiphorTM II 电泳装置, 考马斯亮蓝染色。由于GST的相对慢结合、低转化率和高上样量, 有些上样的蛋白发现在穿透中。

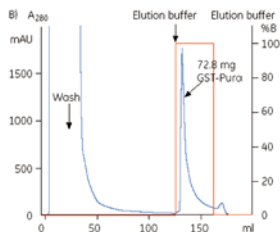


A) GSTrap FF 1 ml

Column: GSTrap FF 1 ml
 Sample: 5 ml extract from *E. coli* expressing GST-Puro
 Binding buffer: PBS (pH 7.4)
 Elution buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 with 10 mM reduced glutathione
 Flow rate: Sample loading: 0.5 ml/min
 Washing and elution: 1 ml/min

Chromatographic procedure: 5 CV binding buffer, 5 ml sample, 20 CV binding buffer, 7 CV elution buffer, 5 CV binding buffer

System: AKTAexplorer 100

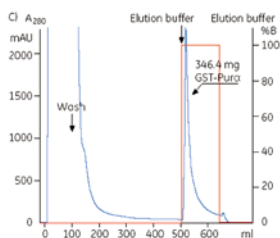


B) GSTrap FF 5 ml

Column: GSTrap FF 5 ml
 Sample: 25 ml extract from *E. coli* expressing GST-Puro
 Binding buffer: PBS (pH 7.4)
 Elution buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 with 10 mM reduced glutathione
 Flow rate: Sample loading: 2.5 ml/min
 Washing and elution: 5 ml/min

Chromatographic procedure: 5 CV binding buffer, 25 ml sample, 20 CV binding buffer, 7 CV elution buffer, 5 CV binding buffer

System: AKTAexplorer 100

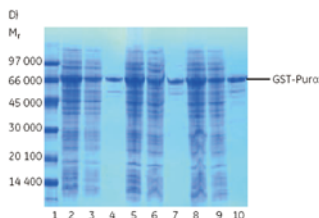


C) GSTPrep FF 16/10 (20-ml column volume)

Column: GSTPrep FF 16/10
 Sample: 100 ml extract from *E. coli* expressing GST-Puro
 Binding buffer: PBS (pH 7.4)
 Elution buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 with 10 mM reduced glutathione
 Flow rate: Sample loading: 5 ml/min
 Washing and elution: 10 ml/min

Chromatographic procedure: 5 CV binding buffer, 100 ml sample, 20 CV binding buffer, 7 CV elution buffer, 5 CV binding buffer

System: AKTAexplorer 100



Lanes

1. LMW markers, reduced
2. Extract of *E. coli* expressing GST-Puro, 1 g cell paste/5 ml
3. Flowthrough from GSTrap FF 1 ml
4. GST-Puro eluted from GSTrap FF 1 ml
5. Extract of *E. coli* expressing GST-Puro, 1 g cell paste/5 ml
6. Flowthrough from GSTrap FF 5 ml
7. GST-Puro eluted from GSTrap FF 5 ml
8. Extract of *E. coli* expressing GST-Puro, 1 g cell paste/5 ml
9. Flowthrough from GSTPrep FF 16/10
10. GST-Puro eluted from GSTPrep FF 16/10

图64: GST-Pur α 蛋白的纯化和规模化放大 (A) GSTrap FF 1ml, (B) GSTrap FF 5ml, (C) GSTPrep16/10, (D) 用Excel Gel (12.5%均一浓度) 胶的SDS-PAGE分析。采用Multiphor II 电泳装置, 考马斯亮蓝染色。由于GST的相对慢结合、低转化率和高上样量, 有些上样的蛋白发现在穿透中。

纯化方法的问题解决

以下解决问题的指南指出了对于大多数纯化方法的普遍问题，对于特别的纯化方法的问题也有提及，这种情况下会指出相应的纯化方法。

问题	可能原因	解决方法
GST 标签蛋白不结合柱子或结合非常弱	GST标签蛋白被机械裂解的方法变性（比如超声）。过分的裂解会使标签蛋白变性，阻止其结合。	在裂解过程中，用温和的机械/化学裂解条件。裂解的条件必须依照经验来决定。
	GST标签蛋白在样品中有聚集，导致沉淀	在细胞裂解前加入DTT，在缓冲液中也加入DTT。1-20mM的DTT会显著增加某些GST蛋白的结合。
	标签蛋白的浓度过低	浓缩样品。结合能力是浓度依赖的。低表达量的蛋白可能不会像高表达量蛋白那样有效地结合柱子。因此，浓缩样品会提高结合。
	标签蛋白可能改变了GST的构象，因此降低了GST标签蛋白的结合能力。	检测所使用的pGEX载体中GST的结合。准备带有所使用的pGEX的细胞超声裂解物，检测其与柱材的结合。如果结合的很好，则可能是标签蛋白改变了GST的构象，因此降低了GST标签蛋白的亲合力。可以通过降低结合的温度到4° C限制洗涤来改善结果。
	平衡时间太短	确认柱材至少用5倍柱体积的pH6.5到8.0的缓冲液平衡过（比如PBS）。
	GST标签蛋白在pH值低于6.5和高于8时结合效率低	在净化好的样品上样前用pH6.5到8.0的缓冲液平衡过（比如PBS）。
	GSTrap柱：柱子需要清洗	根据标准的清洗步骤清洗柱子（见附录2）。如果GSTrap柱已经用过几次了，可能需要换用新柱。
	Glutathione Sepharose柱材使用次数过多	使用新的Glutathione Sepharose柱材（清洗过程请见附录2）
	样品上样过程中的流速过高	降低在上样时的流速。影响GST标签蛋白结合的一个重要参数就是流速。由于GST与谷胱甘肽相对慢的结合，在样品上样过程中保持低流速以获得最大结合能力很重要。
在ÄKTAprime plus上的GSTrap柱：柱子或系统被堵住了，导致高压力和无结合。		柱子堵住了：根据说明书清洁柱子，确认样品已经离心或用0.45µm的滤膜过滤过了。
		系统堵住了：将柱子换成一段管子。如果压力高于0.3MPa，根据手册清洗系统
在ÄKTAprime plus上的GSTrap柱：样品不结合		检测是否使用了正确的柱子。
		检测流入管是否接入了正确的流入端口。 检测缓冲液的组成和pH值是否正确。检测样品是否已经被调节到适合结合缓冲液的条件。

GST 标签蛋白不能被高效的洗脱	洗脱缓冲液的体积不够	增加洗脱缓冲液的体积。有些情况下，尤其是柱上酶切有标签蛋白时，需要更大体积的缓冲液来洗脱标签蛋白。
	洗脱的时间不够	通过降低洗脱过程中的流速来增加洗脱时间。 对于GSTrap柱，为了获得最好的结果，在样品上样时，用0.2到1ml/min的流速（1ml HiTrap柱），0.5到5ml/min的流速（5ml HiTrap柱）。对于离心方法，降低洗脱过程中的离心速度。
	谷胱甘肽的浓度不够	增加洗脱缓冲液中谷胱甘肽的浓度：本方案中建议的10mM浓度对于大多数应用来说足够了，但是也存在例外。尝试使用50mM Tris-HCl，20-40mM 还原型谷胱甘肽，pH8.0作为洗脱缓冲液。
	洗脱缓冲液的pH过低	增加洗脱缓冲液的pH值：将pH增加到8-9会增强洗脱而不用提高洗脱所用谷胱甘肽的浓度。
	洗脱缓冲液的离子强度过低。	增加洗脱缓冲液中的离子强度，在洗脱缓冲液中加入0.1-0.2M的氯化钠也会使结果变好。
	洗脱缓冲液中的谷胱甘肽被氧化了	使用新鲜的洗脱缓冲液。 加入DTT。
	非特异的疏水相互作用导致蛋白和柱材非特异的结合或聚集，从而阻止了标签蛋白的溶解和洗脱。	向洗脱缓冲液中加入非离子去垢剂。加入1%的TritonX-100或2%的n-octylglucoside可以显著提高某些GST标签蛋白的洗脱。
电泳或蛋白质免疫印迹检测发现多条条带	分子量为70 000 的蛋白与GST标签蛋白共纯化	分子量为70 000 的蛋白可能是大肠杆菌dnaK基因的产物。该蛋白参与大肠杆菌中蛋白质折叠。有报道这种相互作用可以通过上样前在50mM Tris-HCl，2mM ATP，10mM MgSO ₄ ，pH7.4中37° C温浴10分钟而破坏。或者把有标签蛋白通过ATP-agarose或相似的纯化介质或进行离子交换层析来除去。
	标签蛋白被蛋白酶部分降解	加入蛋白酶抑制剂。多条条带可能是由于目的蛋白被蛋白酶部分降解的结果。在裂解溶液中加入1mM PMSF可能会使结果变好。一种无毒的水溶性的PMSF替代物是AEBSF，Roche Biochemicals的商品名为Pefabloc SC。注：丝氨酸蛋白酶抑制剂必须在使用凝血酶或凝血因子Xa前除去。Prescission Protease不是一种经典的丝氨酸蛋白酶。经GE Healthcare检测，它对很多蛋白酶抑制剂不敏感。 PMSF有毒，有急性作用。如果可能的话使用Pefabloc SC。

	在宿主细菌中的蛋白降解	用一种蛋白酶缺失型宿主：多条带可能是在宿主细菌中蛋白酶切造成的。如果是这种情况，或许需要蛋白酶缺陷型菌株（比如lon-或ompT）。大肠杆菌BL21随pGEX载体提供。这种菌株是ompT和lon缺陷型菌株。
	在机械裂解过程中细胞破碎	降低裂解时间：细胞裂解表面上是使悬浊液部分澄清，可以通过镜检测。机械裂解前加入溶菌酶（0.1倍体积的10毫克/毫升溶菌酶溶液，溶菌酶保存在25mM Tris-HCl,pH8.0）可能会使结果变好。避免发泡，因为这可能使标签蛋白变性。过分裂解也会导致宿主细胞蛋白和GST标签蛋白共纯化。
	分子伴侣可能被共纯化了	包括额外的纯化步骤：多余的条带可能由于共纯化一些分子伴侣所造成。这些分子伴侣参与大肠杆菌中新生成的蛋白的正确折叠。这些包括，但不仅仅是：DnaK（分子量70 000）DnaJ（分子量37 000）GrpE（分子量40 000）GroEL（分子量57 000）GroES（分子量10 000）。一些从这些共纯化的蛋白中分离GST标签蛋白的方法已经发表。
	抗体和很多种大肠杆菌中的蛋白反应	抗体和大肠杆菌蛋白交叉反应：取决于抗GST抗体的来源。它可能包含一些抗体，这些抗体与标签蛋白样品中的大肠杆菌蛋白能够反应。通过和大肠杆菌的超声裂解物反应来除掉那些能够交叉反应的抗体。GE Healthcare的GST抗体已经和大肠杆菌蛋白进行过交叉吸附，并检测证明其在蛋白质免疫印迹中没有非特异条带。
目的蛋白酶切后电泳检测发现多条条带	蛋白酶切发生在宿主细菌内	检测条带何时出现：确定多余的条带在Precision Protease，凝血酶，凝血因子Xa切割前不存在。这些条带可能是在宿主细菌中降解的结果。 目的蛋白可能含有Precision Protease，凝血酶，凝血因子Xa的切割位点，检查序列。细节请参见《GST基因融合系统手册》。

GST标签蛋白的检测

检测GST标签蛋白有多种方法，选用不同的方法主要取决于实验条件。例如，SDS-PAGE分析方法虽然在表达和纯化过程中经常被用来监测实验结果，但对于常规监测高通量筛选的样品一般不使用这种方法。基于感兴趣蛋白（而不是GST标签）的性质进行的功能性检测通常比较有用，但必须为某一特定蛋白而设计。后者在本手册中并未提及。

很多下面展示的信息可以应用到检测组氨酸标签蛋白，虽然需要更换特异性的试剂。

用于ELISA的GST 96孔检测模块

GST 96孔检测模块提供了高特异性的酶联免疫吸附分析（ELISA）用于检测净化的裂解物和中间纯化组分是否含有GST标签蛋白（见图65和66）。样品直接加到板子的孔中，GST标签蛋白由特异的固定在每个孔壁上的抗GST抗体捕获。在通过洗涤来除去未结合的物质后，所捕获的GST标签蛋白用模块中提供的辣根过氧化物酶/抗GST抗体复合物监测。用于为标签蛋白定量的标准曲线可以用纯化的重组GST来制作，这也作为对照包含在模块中。每个检测模块含有足够进行96个检测的试剂。每个板是12条组成的阵列，每条有8个孔。这样的话每次最少可以同时分析8个样品（1条）。

GST 96孔检测模块也可以和GST标签所融合的蛋白的抗体一起使用来筛选和检测表达需要的GST标签蛋白的克隆。

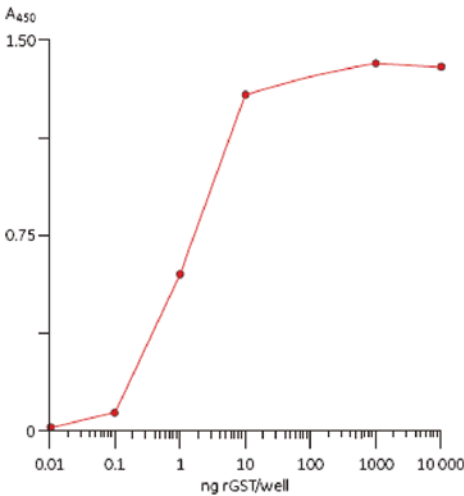


图65：用GST 96孔检测模块能够灵敏的监测重组GST蛋白。重组GST蛋白用1×封闭缓冲液，100 μl 体积直接上样到GST 96孔检测模块的孔中。在室温结合1小时后，空用洗涤缓冲液洗涤，然后与辣根过氧化物酶/抗GST抗体复合物以1:1000的稀释温浴1小时。检测使用TMB作为底物，每孔的吸光值在450nm测量。

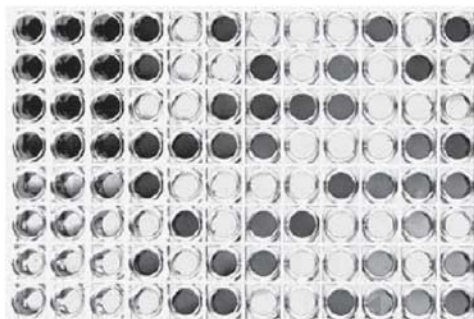


图66：用GST 96孔检测模块筛选表达GST标签蛋白的细菌裂解物。



每种标签蛋白都被单独捕获。因此，如果需要定量，用重组GST蛋白制作标准曲线，目的蛋白用1×封闭缓冲液进行从1ng/μl到1pg/μl的一系列稀释。每次检测时都需要包含重组GST蛋白作为标准对照。



每天准备新鲜的缓冲液。

GST 96孔检测模块的组成

GST 96孔检测板（每孔用山羊抗GST的多克隆抗体包被，封闭，干燥）

偶联了辣根过氧化物酶的山羊抗GST的多克隆抗体（HRP/Anti-GST）

纯化的重组GST标准蛋白

ELISA额外需要的试剂

磷酸缓冲液：140mM 氯化钠，2.7mM 氯化钾，10mM 磷酸氢二钠，1.8mM 磷酸二氢钾，pH7.3

洗涤缓冲液：在PBS中添加0.05% Tween20（500ml/96孔板）室温储存。

封闭缓冲液（1×）：在PBS中添加3%脱脂奶粉，用0.05%Tween 20（10ml/96孔板）

封闭缓冲液（2×）：在PBS中添加6%脱脂奶粉，用0.1%Tween 20（5ml/96孔板）

底物

过程

1. 用1×PBS将每个检测的样品稀释至50μl。
2. 向每个样品中加入50μl 2×封闭缓冲液。
3. 在筛选过程中，用1×封闭缓冲液稀释重组GST蛋白标准到1ng/100μl。
4. 在定量过程中，对于重组GST蛋白和待检测的蛋白用1×封闭缓冲液准备一系列稀释样品，浓度从1ng/μl到1pg/μl。
5. 将96孔板从袋子中拿出来。



如果使用少于96孔，小心的从底座中向上推出孔条，把没有使用的孔条和提供的干燥剂一起保存在袋子中。

6. 吸取100 μ l样品到每个孔中。
7. 用加湿了的容器或培养箱在室温温浴1小时。
8. 翻转板子，快速轻拍，除去孔中的溶液。



具有生物危害性的样品应该用移液器或吸到一个合适的容器中。

9. 将板子或孔条置于纸巾上除去多余的液体。
10. 每孔用洗涤缓冲液洗涤5遍，每次翻转板子，快速轻拍，除去孔中的溶液。
11. 将板子或孔条置于纸巾上除去多余的液体。
12. 将辣根过氧化物酶/抗GST抗体复合物以1:10 000的比例稀释（1 μ l到10ml中）。



每个96孔板需要10ml稀释的复合物

13. 向每孔中加入100 μ l的辣根过氧化物酶/抗GST抗体复合物，用加湿了的容器或培养箱在室温温浴1小时。
14. 清空板子中的溶液，像前文描述的那样用洗涤缓冲液洗涤两次。
15. 向每孔中加入可溶性的辣根过氧化物酶底物，根据供应商的说明温浴。
ABTS底物（A410）曾被成功使用。
16. 用酶标仪或分光光度计读取板子的吸收。

使用CDNB酶活检测的GST检测模块

用pGEX载体表达的GST标签蛋白可以用GST的底物CDNB以酶活的形式检测，该方法也包含于GST检测模块中。GST街道的CDNB和谷胱甘肽的反应产生一个产物，能够用340nm的吸收使用酶标仪或紫外/可见分光光度计检测。在10分钟内能够给出细菌粗超声物、柱子洗脱或纯化的GST标签蛋白的检测结果。图67显示CDNB分析的典型的结果。每个GST检测模块包含足够50次分析的试剂。

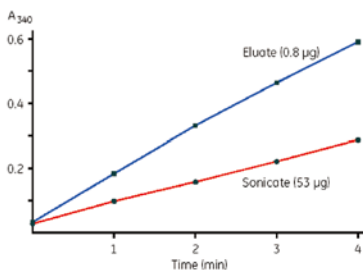


图67：典型的GST标签蛋白的CDNB分析结果。53 μ g的大肠杆菌TG1/pGEX-4T-Luc超声后的总蛋白和0.8 μ g从Glutathione Sepharose上洗脱的总蛋白根据GST检测模块中的说明进行分析的结果。

使用CDNB酶活检测的GST检测模块的组成

10×反应缓冲液：1M磷酸二氢钾缓冲液，pH 6.5

CDNB: 100mM 溶于乙醇的CDNB

还原型谷胱甘肽粉末：将谷胱甘肽溶解于灭菌的蒸馏水中制备100mM的储液。分装到微量离心管中。保存在-20° C。避免多余5次的反复冻融。



CDNB有毒，避免和眼睛、皮肤和衣物接触。如果不小心发生接触，用水冲洗接触的部位。如果吞服，请立即就医。



含有pGEX质粒的细胞必须先裂解再进行CDNB检测。

步骤

1. 在微量离心管中，合并如下试剂：

蒸馏水 880μl

10×反应缓冲液 100μl

CDNB 10μl

谷胱甘肽溶液 10μl

总体积 1000μl

2. 盖好离心管盖，颠倒数次以混匀。



CDNB可能导致溶液变得微微发浑。然而，混匀后，溶液应该是清澈的。

3. 将以上配好的500μl CDNB溶液加到两个紫外比色杯中，标记上样品和空白。像样品杯中加入样品（5-10μl）。向空白杯中加入与样品等体积的1×反应缓冲液。
4. 将每个比色杯用蜡膜封好，颠倒混匀。
5. 将空白杯放置于分光光度计中，在340nm进行清零。测量样品杯中在340nm的吸收，同时用秒表或其他计时器计时。
6. 以1分钟为时间间隔测量5分钟340nm的吸收，首先用空白杯清零分光光度计，然后放入样品杯进行测量。



对于用96孔板分析，先向每孔中加入样品，然后加入试剂。用移液器混匀孔中的溶液。用酶标板测量吸光值。

7. 按照如下公式计算A340/min/ml样品：

$$\Delta A_{340}/\text{min}/\text{ml} = [A_{340}(t_2) - A_{340}(t_1)] / [(t_2 - t_1) \text{ (加入样品的体积, 单位毫升)}]$$

A340(t2): t2时间（单位分钟）时340nm的紫外吸收

A340(t1): t1时间（单位分钟）时340nm的紫外吸收

$\Delta A_{340}/\text{min}/\text{ml}$ 值可以作为比较所给定样品的GST-标签蛋白含量的相对指标。



通过做一个 $\Delta A_{340}/\text{min}$ 对 标签蛋白量的标准曲线可以使这个检测适用于对标签蛋白进行绝对定量。需要纯化的标签蛋白样品来制作曲线。

该检测只能检测有活性的GST。有些GST标签蛋白可能失去了GST的活性。



GST的活力可能受到融合蛋白的影响。对于某个标签蛋白来说，所获得的吸光值读数可能不能反映存在的标签蛋白的真实数量。

Western blot分析

可以用Western blot分析方法监测GST标签蛋白的表达和纯化过程，使用ECL、ECL plus或ECL高级检测系统能够提高检测灵敏度。蛋白免疫印迹分析检测和全蛋白的SDS-PAGE染色（考马斯亮蓝或银染）的结合为纯化结果提供了非常有力的对照。

需要的试剂

抗GST的抗体（山羊多抗）

封闭/孵育溶液：5%（w/v）脱脂干奶粉和0.1%（v/v）Tween20，溶于1×PBS（140mM 氯化钠，2.7mM 氯化钾，10mM 磷酸氢二钠，1.8 mM 磷酸二氢钾，pH7.3）

洗涤溶液：0.1%（v/v）Tween20 溶于1×PBS（同上）

检测GST抗体的二抗（如HRP偶联的抗山羊的抗体）

合适的膜，如Hybond ECL（用于后续ECL检测）或Hybond P（用于后续ECL或ECL plus检测）

1. 将蛋白样品用SDS-PAGE分离。



虽然GE Healthcare的抗GST抗体已经被大肠杆菌蛋白交叉吸附，但仍有可能存在较低水平的交叉反应，因此通常使用不含有pGEX质粒的大肠杆菌超声样品作为含pGEX质粒大肠杆菌样品的对照。

2. 将电泳胶上已被分离的蛋白转移至膜上。

电泳和转膜时可使用多种仪器和试剂，详细信息请参考GE Healthcare的《蛋白电泳技术手册》和《Hybond ECL指导手册》。

封闭膜

1. 将已经转移有蛋白的膜转入合适大小的容器中，如培养皿。

2. 加入50-200毫升封闭/孵育溶液。

3. 室温下缓慢摇动孵育1-16小时，或者在4° C封闭过夜。

4. 倒出并丢弃封闭液。



使用封闭/孵育溶液较长时间的封闭能够降低背景的信号。

膜与一抗孵育

1. 用封闭/孵育溶液将一抗按适当的比例稀释（如5-10 μ l一抗稀释到50ml溶液中）。
2. 将抗体溶液混合物加入到装有膜的容器中。
3. 室温缓慢摇动1小时。
4. 倒出并丢弃抗体溶液。
5. 用20-30ml的洗涤液漂洗膜以除去大部分尚未结合的抗体。
6. 倒出并丢弃漂洗溶液。
7. 室温用20-30ml封闭/孵育液或洗涤溶液缓慢摇动洗膜10-60分钟。
8. 丢弃溶液并按步骤7重复洗膜。

膜与二抗孵育

1. 按照推荐的比例用封闭/孵育液稀释抗山羊的二抗。
2. 将抗体溶液混合物加入到装有膜的容器中。
3. 室温缓慢摇动1小时。
4. 倒出并丢弃抗体溶液。
5. 用20-30ml的封闭/孵育液或洗涤液漂洗膜以除去大部分尚未结合的抗体。
6. 倒出并丢弃漂洗溶液。
7. 室温用20-30ml封闭/孵育液或洗涤溶液缓慢摇动洗膜10-60分钟。
8. 丢弃溶液并用洗涤溶液重复洗膜。



在步骤9中使用洗涤溶液，不能用封闭/孵育液。在封闭/孵育液中的蛋白可能会对显影步骤造成影响。

9. 使用偶联二抗合适的底物显影。



有关蛋白免疫印迹分析抗体浓度的进一步信息请参考GE Healthcare Application Note 18-1139-13。



ECL、ECL plus和ECL高级检测系统在使用很少量抗体的条件下即可达到足够的灵敏度，因此在这些步骤中可使用最少量的抗体（一抗和二抗）。可以将体系缩小或在密封的塑料袋中孵育以减少所用的抗体溶液。

GST Western blotting检测试剂盒

GST Western blotting检测试剂盒有利于使用化学发光法对GST标签蛋白进行Western blott检测，这一方法可用于检测细菌超声的粗产品、柱子洗脱物或纯化的GST标签蛋白。与生化方法不同的是该方法不依赖于GST的活性，而GST的活性很可能受标签蛋白折叠的影响。

GST 蛋白免疫印迹分析检测试剂盒的成分

抗GST-HRP偶联物：辣根过氧化物酶（HRP）偶联的山羊抗GST的多克隆抗体

75μl于含50%甘油的PBS中

rGST阳性对照：重组谷胱甘肽硫转移酶。10μl以5mg/ml溶于PBS的蛋白溶液

ECL封闭剂：20g

ECL检测试剂：检测试剂1（125ml），检测试剂2（125ml），足够用于2000cm²的膜。

另外所需试剂

磷酸盐缓冲液（PBS），pH7.5：配1L溶液时，将11.5g无水磷酸氢二钠（80mM）、2.96g磷酸二氢钠（20mM）和5.84g氯化钠（100mM）溶于1L蒸馏水中，调pH值。

Tris盐缓冲液（TBS），pH7.6：配1L溶液时，将20ml 1M的Tris-HCl，pH7.6（20mM）和8g 氯化钠加入至1000ml蒸馏水中，调pH值。

PBS-Tween（PBST）和TBS-Tween（TBST）：用相应的溶液稀释所需量的Tween 20。0.1%浓度的Tween 20对大部分印迹应用都比较合适。



不要使用叠氮钠作为杀菌剂，因为它能够抑制山葵辣根过氧化物酶。

凝胶电泳

1. 根据标准技术进行SDS-PAGE
2. 上样100ng重组的GST蛋白（试剂盒中提供）作为阳性对照。

这一方法已经在纯化的蛋白和细菌粗裂解物中得到应用。抗GST抗体已经被大肠杆菌蛋白交叉吸附，但这一过程可能不能够除去所有交叉反应的抗体。因此我们推荐使用不含有pGEX质粒的大肠杆菌裂解物作为对照。

Western blotting

1. 使用标准方法将蛋白转移至膜上。
- 2a. 在印迹之前将Hybond PVDF用蒸馏水预先浸湿，并在转移缓冲液中平衡5-10分钟。
- 2b. 在使用转移缓冲液平衡和印迹之前将Hybond PVDF用100%甲醇浸泡，之后用蒸馏水漂洗。



推荐使用硝酸纤维素膜，但PVDF膜已经证明能够获得与之媲美的结果。

免疫检测

1. 为封闭非特异性结合的位点，将膜浸泡在溶于PBST或TBST的5% ECL封闭试剂中于室温在平板摇床上摇动1小时。
2. 用PBST或TBST洗涤溶液漂洗膜两次。
3. 用PBST或TBST稀释抗GST-HRP 偶联物，1:5000的稀释被认为对多数应用都比较合适。用足够的抗体溶液盖住膜（至少0.25ml/cm²），在平板摇床上室温孵育1小时。
4. 用PBST或TBST洗涤溶液漂洗膜两次，用>4ml/cm²的洗涤溶液在室温温和振荡以洗涤膜。
5. 用新鲜更换的洗涤溶液洗涤膜，室温温和振荡3×5分钟。



这一方法已被优化以提供较好的信噪比，能够获得强信号和干净的背景。使用者可以发现通过增加所用偶联物的浓度能够提高灵敏度，但这样也可能会增加背景。



本试剂盒提供了ECL检测试剂，但同样可以使用ECL Plus检测试剂。当使用ECL Plus试剂时，应增加偶联物的稀释度至2-4倍以使背景降低到可接受的水平。

ECL检测

1. 准备ECL检测试剂，等体积混合溶液1和溶液2。
 准备足够的体积以盖住膜（推荐至少0.125ml/cm²）。
虽然混合的试剂能够在室温稳定1小时，但通常在即将使用之前再混合。
2. 吸干漂洗的膜上多余的洗涤溶液，将其蛋白面朝上放在塑料片或其它合适的干净表面上。吸取混合的试剂至膜上，孵育1分钟。
3. 一旦膜暴露在检测试剂中即要迅速操作。用薄纸吸干膜边缘多余的试剂，将膜的蛋白面朝下放在新的塑料片上包裹起来，小心操作以消除任何气泡。
4. 将包裹的膜蛋白朝上放入X光线胶片盒中。
5. 之后的操作在暗室中的红光下完成。将一片自显影的胶片放到膜上，盖上盒子曝光1分钟。
6. 移去胶片，再放入另一张未曝光的胶片。立即冲洗第一张胶片，根据第一张胶片上出现影像的时间估计第二章胶片的曝光时间，这个时间可能从5分钟到1小时不等。

考马斯亮蓝或银染SDS-PAGE

SDS-PAGE对于在表达和纯化过程中检测标签蛋白非常有用。表达所需标签蛋白的转化子可通过原有GST蛋白的缺失和新出现一个较大分子量的标签蛋白进行鉴别。原有的pGEX载体能够产生一个分子量为29000的GST标签蛋白，这一蛋白包含了编码pGEX多克隆位点的氨基酸。

所需试剂

6×SDS上样缓冲液：0.35M Tris-HCl，10.28%（w/v）的SDS，36%（v/v）的甘油，0.6M DTT（或2-巯基乙醇），0.012%（w/v）的溴酚蓝，pH6.8。分装成0.5ml储存在-80° C。

凝胶电泳

- 1. 视情况加1-2μl 6×SDS上样缓冲液至5-10 μ l的粗提物、细胞裂解物或纯化组分的上清中。
- 2. 漩涡振荡并在90° C-100° C加热5分钟。
- 3. 简单离心，之后将样品上样到SDS-聚丙烯酰胺胶中。
- 4. 凝胶跑至合适的时间，用考马斯亮蓝（考马斯亮蓝R片剂）或银（PlusOne 银染试剂盒，蛋白）染色。

 应根据感兴趣蛋白的分子量选用SDS-聚丙烯酰胺凝胶中丙烯酰胺的浓度（见表19）。

表19： 为分离蛋白选择合适的凝胶成分。

在分离胶中的丙烯酰胺浓度（%）		分离大小范围（Mr×103）
单一浓度	5%	36-200
	7.5%	24-200
	10%	14-200
	12.5%	14-100
	15%	14-601
梯度浓度	5-15%	14-200
	5-20%	10-200
	10-20%	10-150

1更大的蛋白在胶中迁移不显著。

蛋白免疫印迹分析没有信号	蛋白免疫印迹分析中蛋白没有被转移至膜上	• 解决方法
	蛋白没有能保留在膜上	• 如果在5分钟的时间过程中，A340值不超过0.8，CDNB检测方法的反应速度是线性的。将初始的结果作图，来确认在时间过程中反应速度是线性的。调节含有GST标签蛋白的样品量来保持线性反应速度。
	检测试剂有问题	• 标签蛋白可能抑制GST部分的正确折叠，因此GST标签蛋白可能在CDNB检测中活性较低 • 无论什么原因，如果使用CDNB方法获得的吸收比较低，使用抗GST抗体做蛋白免疫印迹分析可能显示出标签蛋白较高的表达水平。
	蛋白的转膜效率低	• 在22° C的标准反应条件并且没有GST和谷胱甘肽的情况下，CDNB自发的反应形成化合物，能够产生基线漂移，速度为$\Delta A_{340}/\text{min}$约为0.003（或5分钟内0.015）。在每次读取样品杯吸收前都用空白杯进行清零可以修正基线漂移。或者用分光光度计软件直接得到一条斜线。斜线的持续时间应该和自发反应的时间相同。
	上样的蛋白量少	• 检测宿主细胞是否被充分诱导，样品是否充分裂解，没有形成包涵体。（见纯化方法问题解决）
	曝光时间太短	• 如果检测的是净化后的裂解物，将初始的GST样品与2×封闭缓冲液混合，使终浓度为1×封闭缓冲液。
	偶联物的浓度太低	• 确定所有的孵育时间都恒定。GST捕获时间可因信号稍弱而有所增加，但孵育时间不能少于30分钟。HRP/抗GST偶联物的孵育时间每减少15分钟即可显著降低信号。

蛋白免疫印迹分析中存在过多的弥散信号	蛋白免疫印迹分析中蛋白没有被转移至膜上	• 所有蛋白染色分别染胶和膜检查转移效率。优化凝胶中丙烯酰胺的浓度、转移时间和转移电流。 • 确保印迹过程中凝胶和膜有合适
	蛋白没有能保留在膜上	• 评估蛋白转移（如上）。使用新提供的膜。
蛋白免疫印迹分析的背景太高	检测试剂有问题	• 确认正在使用的试剂是正确的。每次准备新鲜的试剂，在正确的温度储存试剂。
	蛋白的转膜效率低	• 同上检查转膜效率。
	上样的蛋白量过少	• 将更多的蛋白上样至凝胶中。
	曝光时间太短	• 增加胶片的曝光时间，可能需要增加至1小时。
蛋白免疫印迹分析中能检测出多条带	偶联物的浓度太低	• 推荐使用1:5000的稀释度，但在某些情况下需要使用较浓的溶液--尝试1:1000
	上样蛋白量太多	• 减少蛋白的上样量。
	偶联物的浓度过高	• 推荐使用1:5000的稀释度，但在某些情况下需要进一步稀释—尝试1:10000
	洗涤不充分	• 确保偶联物之后的洗涤有足够的时间和足够体积的洗涤溶液（>4ml/cm²膜）。
	封闭不充分	• 检查封闭溶液得以正确配制。每次都使用新鲜配制的封闭溶液。 • 增加封闭剂的浓度--尝试10%。 • 使用其它的封闭剂（如1%-10%的BSA，0.5%-3%的明胶）。 • 增加封闭溶液的孵育时间。
	印迹设备或溶液有污染	• 清洁仪器。准备新鲜溶液。
	偶联物的浓度过高	• 推荐使用1:5000的稀释度，但在某些情况下需要进一步稀释。
	偶联物与其它蛋白非特异结合	• 加入不含有表达载体的表达宿主为阴性对照以确定非特异性结合。

用酶切的方法除去GST标签

如果要对目的蛋白进行功能或结构研究，除掉GST标签经常是必要的。含有PreScission Protease、凝血酶、凝血因子Xa的标签蛋白能够在蛋白仍旧结合在Glutathione Sepharose上时或在洗脱后的溶液中被酶切。

-  PreScission Protease本身带有GST标签，因此会结合在Glutathione Sepharose上。因此，它不会和切割后的目的蛋白共同洗脱并污染目的蛋白。用PreScission Protease酶切会提供高特异性，而且在冷环境中会获得最大的切割效率（该蛋白在4° C活力最高），因此提高目的蛋白的稳定性。
-  如果凝血酶或凝血因子Xa用于切除标签，一个方便的除去这些酶的方法是将一根GSTrap FF柱和一根 HiTrap Bezamidine FF (High sub) 柱串联使用。在洗脱过程中，酶切产物经过GSTrap柱后直接流到HiTrap Bezamidine FF (High sub) 柱中。切割的目的蛋白流过HiTrap Bezamidine FF (High sub) 柱，而蛋白酶则结合在上面。这样，仅用一步就除去了酶并获得了纯的切割后的目的蛋白（见下面的图68）。然而需要注意的是凝血酶或凝血因子Xa的酶切可能会有较低的特异性，有时目的蛋白自身会被切割。

表20：用于SDS-PAGE分析的大概分子量

蛋白酶	分子量
PreScission Protease1	46000
牛凝血酶	37000
牛凝血因子Xa	48000

PreScission Protease 是GST和人14型鼻病毒3C蛋白酶的融合蛋白。

-  对于完全切割所需的酶量、温度和温育时间根据不同的GST标签蛋白而不同。最优的条件通常应该通过实验确定。
-  如果在裂解溶液中使用了蛋白酶抑制剂（见表21），它们必须在用PreScission Protease、凝血酶、凝血因子Xa前除去（抑制剂通常会在样品上样到GSTrap柱时穿透）。

表21：各种蛋白酶的抑制剂

酶	抑制剂
PreScission Protease	100mM 氯化锌（>50%的抑制）
	100 μ M chymostatin
	4mM Pefabloc
凝血因子Xa和凝血酶	AEBSF, APMSF, 抗凝血因子III, Antipain, α 1-antitrypsin, aprotinin, chymostatin, hirudin, leupeptin, PMSF
只抑制凝血因子Xa	Pefabloc FXa
只抑制凝血酶	Pefabloc TH Benzamidine

Cleavage of GST tag using PreScission Protease

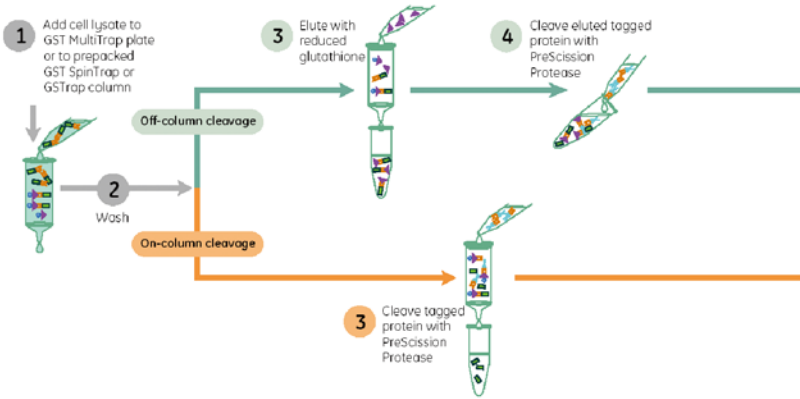


图68A：亲和层析纯化流程和用Precision Protease切割GST标签蛋白。

Cleavage of GST tag using thrombin or Factor Xa

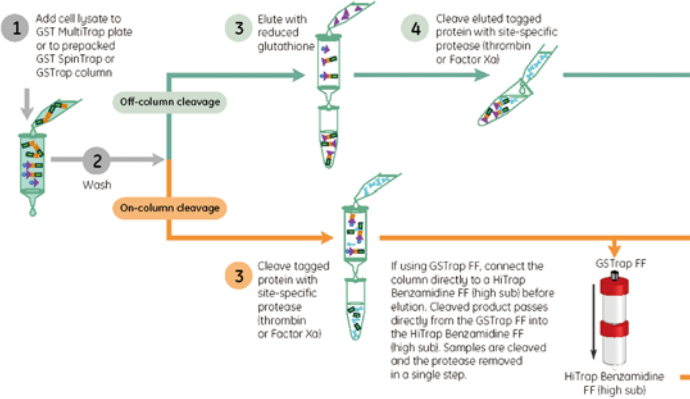
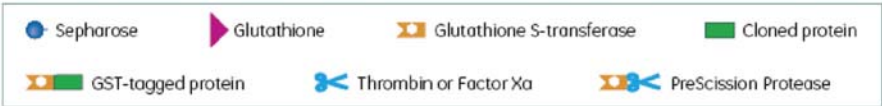
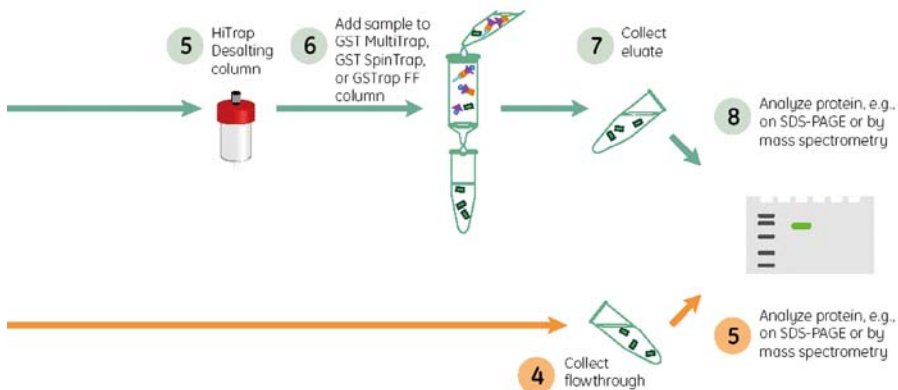
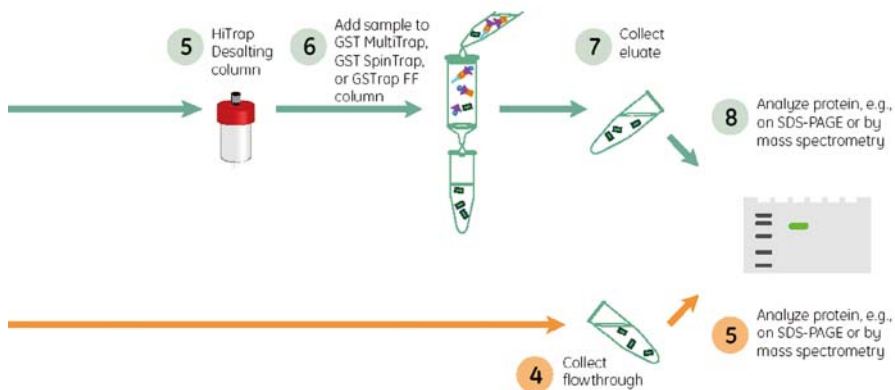


图68B：亲和层析纯化流程和用凝血酶或凝血因子Xa切割GST标签蛋白。





目的蛋白的切割通常在毫克量级进行，该量级的标签蛋白适合用GSTrap柱纯化。下面的方案描述了用1ml或5ml GSTrap柱手动切割并纯化蛋白。该方案同样可以适用于使用GST MultiTrap或GST SpinTrap柱在较小规模工作。

对于快速的将纯化规模化放大，2根或3根GSTrap柱可以串联使用（柱压可能会提高）。进一步的规模化放大可以用GSTPrep FF 16/10或使用者自装的柱子来实现。如下的方案包含了用柱子或Glutathione Sepharose 4 Fast Flow批量形式进行工作，但介质可以简单的用Glutathione Sepharose High Performance或Glutathione Sepharose 4B 进行。选用哪种介质决定于实验室的偏好。

切割并纯化结合在GSTrap FF 上的标签蛋白

建议使用的缓冲液

结合缓冲液：PBS：140mM 氯化钠，2.7mM 氯化钾，10mM 磷酸氢二钠，1.8mM 磷酸二氢钾，pH7.3

对于Precision Protease酶切：

洗脱缓冲液：50mM Tris-HCl，10mM 还原型谷胱甘肽，pH8.0

酶切缓冲液：50mM Tris-HCl，150mM 氯化钠，1mM EDTA，1mM DTT，pH7.0

Precision Protease

对于凝血酶酶切：

洗脱缓冲液：50mM Tris-HCl，10mM 还原型谷胱甘肽，pH8.0

酶切缓冲液：PBS：140mM 氯化钠，2.7mM 氯化钾，10mM 磷酸氢二钠，1.8mM 磷酸二氢钾，pH7.3

凝血酶溶液：用0.5ml预冷到4° C的PBS溶解500单位的凝血酶。温柔混匀。将溶液分装成小份储存在-80° C保持酶活。

对于凝血因子Xa酶切：

洗脱缓冲液：50mM Tris-HCl，10mM 还原型谷胱甘肽，pH8.0

酶切缓冲液：50mM Tris-HCl，150mM 氯化钠，2mM 氯化钙，pH7.5

凝血因子Xa溶液：用4° C的水溶解400单位的凝血因子Xa，使终浓度达到1U/μl。温柔混匀。将溶液分装成小份储存在-80° C保持酶活。

纯化和酶切



如下的方案是为8mg目的蛋白优化过的例子。值得估计上样到柱子上的蛋白量，因为这能使加入的酶量最少化。

1. 用蒸馏水充满注射器，移除塞子，把柱子用提供的Luer接头连接到注射器上，保持接头处有液体，避免向柱子中引入气泡。如果在柱子中发现有气泡，用蒸馏水冲洗，直到气泡消失。
2. 掰掉底部封口。
3. 用3到5个柱体积的蒸馏水洗涤柱子。
4. 用5个柱体积的结合缓冲液平衡柱子。建议的流速是1ml/min（1ml柱）和5ml/min（5ml柱）。
5. 用注射器或者蠕动泵加入预处理的样品，为了获得最好的结果，在上样时，用0.2-1ml/min（1ml柱子）和0.5-5ml/min（5ml柱子）的流速。
6. 用结合缓冲液洗涤至少5到10个柱体积，直到吸收达到平稳的基线或在流出物中没有物质流出。在洗涤的过程中保持流速为1-2ml/min（1ml柱子）和5-10ml/min（5ml柱子）。
- 7a. 如果用Precision Protease和凝血因子Xa切割的话用10个柱体积的酶切缓冲液洗涤柱子。
- 7b. 如果用凝血酶切割的话跳转到步骤8b。
- 7c. 如果用凝血因子Xa切割的话跳转到步骤8c。
- 8a. 准备Precision Protease混合物：
对于1ml GSTrap FF，在5° C混合80μl（160单位）的Precision Protease和920μl的Precision Protease 酶切缓冲液。
对于5ml GSTrap FF，在5° C混合400μl（800单位）的Precision Protease和4.6ml的Precision Protease 酶切缓冲液。
- 8b. 准备凝血酶混合物：
对于1ml GSTrap FF，混合80μl（80单位）的凝血酶和920μl的PBS。
对于5ml GSTrap FF，混合400μl（400单位）的凝血酶和4.6ml的PBS。
- 8c. 准备凝血因子Xa混合物：
对于1ml GSTrap FF，混合80μl（80单位）的凝血因子Xa和920μl的凝血因子Xa酶切缓冲液。
对于5ml GSTrap FF，混合400μl（400单位）的凝血因子Xa和4.6ml的凝血因子Xa酶切缓冲液。
9. 将蛋白酶混合物用注射器和提供的接头上样到柱子中。用顶部和底部的塞子封上柱子。
- 10a. 对于Precision Protease，将柱子在5° C保温4小时。
- 10b. 对于凝血酶和凝血因子Xa，在室温（22-25° C）温育2-16小时。

给出的温育的时间只是一个起始条件，需要根据酶切后目的蛋白的最优产率来改变。

11. 将注射器用3ml（1ml柱）和15ml（5ml柱）酶切缓冲液装满。除掉顶部和底部的塞子，连接注射器，避免向柱子中引入气泡。
12. 开始洗脱目的蛋白。保持流速为1-2ml/min（1ml柱）或（5ml柱），收集洗脱物（1ml柱每管0.5-1ml，5ml柱每管1-2ml）。

对于Precision Protease: 洗脱物会含有目的蛋白，而GST标签和Precision Protease（也是GST标签的）仍旧会留在GSTrap柱上。这意味着目的蛋白不会被蛋白酶污染，因此不需要额外的纯化步骤来把目的蛋白与蛋白酶分离出来。

对于凝血酶和凝血因子Xa: 洗脱物中会含有目的蛋白和凝血酶或凝血因子Xa。而GST标签则会留在GSTrap柱上。凝血酶和凝血因子Xa可以用串联在GSTrap后的HiTrap Bezmidine FF (High sub) 一步除去。在这个过程中，被切割的标签蛋白和凝血酶或凝血因子Xa从GSTrap柱上洗脱下来进入HiTrap Bezmidine FF (High sub)柱。第二根柱捕获凝血酶或凝血因子Xa，从而在洗脱中收集纯的没有蛋白酶的目的蛋白。参照第3个应用案例作为使用凝血酶和GSTrap FF纯化和柱上酶切GST标签的SH2结构域的例子，该例子中用与GSTrap FF串联的HiTrap Bezmidine FF (High sub)来纯化蛋白酶。

再生GSTrap柱以供继续纯化的细节请参见附录2。

应用举例

1. 使用GSTrap FF柱纯化人Hippocalcin蛋白并通过PreScission蛋白酶进行柱上切割

人Hippocalcin基因是神经元特异性的钙结合蛋白家族成员，该基因被克隆到pGEX载体上，这一载体的GST标签附近含有PreScission蛋白酶的酶切位点。表达的标签蛋白用GSTrap FF 1ml柱子吸附，随后在4° C用PreScission蛋白酶（该蛋白酶自身带有GST标签）孵育过夜，之后在室温继续孵育2小时。柱上酶切后在第一个柱子后再连接另一个GSTrap FF 1ml柱以尽可能除去PreScission蛋白酶、未能切割的GST标签蛋白或自由的GST标签，GST标签能够在使用结合缓冲液洗涤的过程中与样品一同被洗脱下来（图69）。每克湿重的大肠杆菌能够收获10mg纯的不带标签的Hippocalcin蛋白。

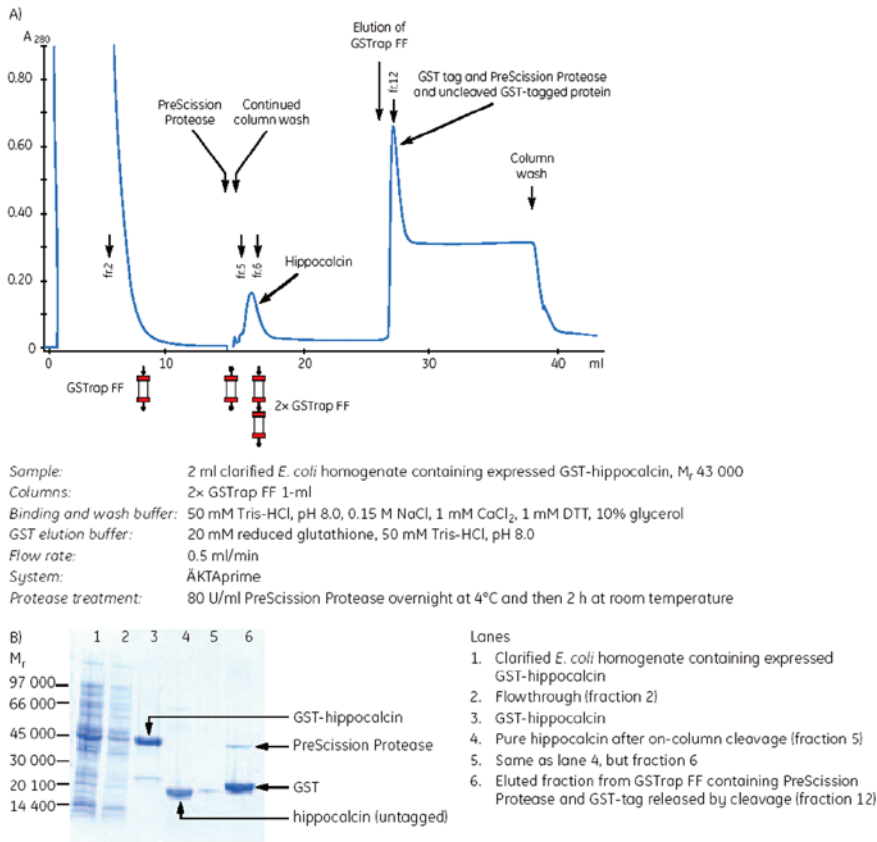


图69：使用GSTrap FF柱纯化人Hippocalcin蛋白、柱上酶切并去除PreScission蛋白酶。A）纯化hippocalcin的色谱图。B）不同样品纯化过程的SDS-PAGE分析。ExcelGel的SDS梯度：8-16%，考马斯亮蓝染色。

2. 用PreScission蛋白酶自动去除GST标签

本例使用ÅKTAexpress自动去除标签。所有使用ÅKTAexpress的多步纯化步骤都可使用自动柱上标签切割，切割标签通常在亲和柱上并在下一步纯化之前进行。当酶切蛋白被洗脱后，亲和柱被再生，亲和标签、带有标签的蛋白酶和没有被切割的蛋白在另一个出口收集。这个过程包括标签蛋白的结合，注入蛋白酶，温育，洗脱切割的蛋白并收集在上样环中，被后续的步骤继续纯化。

图70的例子显示GST标签蛋白的纯化结果：大肠杆菌中表达的GST-Pur α（分子量61 600）。酶切后产物的相对分子量为 35 200。收集后，细胞用超声裂解，样品通过在上样前的离心净化。在ÅKTAexpress上用如图所示的柱子进行了亲和层析（AC）和凝胶过滤层析（GF）。每个样品的纯度用SDS-PAGE分析（考马斯亮蓝染色）。还原的样品上样到ExcelGel SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。

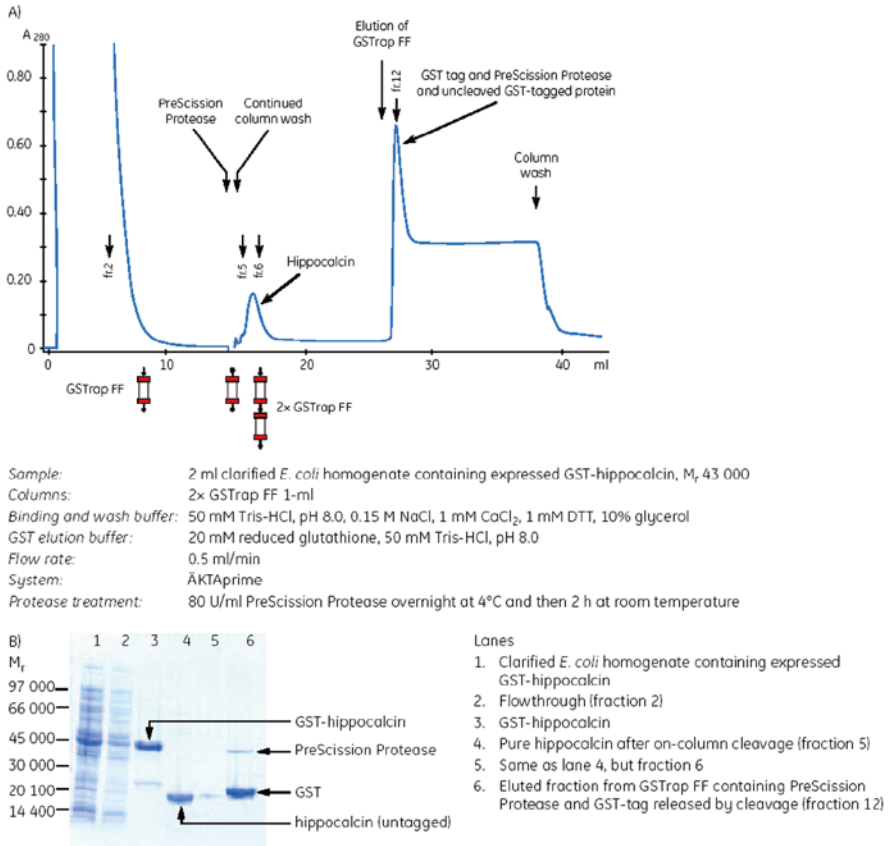


图70: (A)包含用Precision Protease自动进行GST标签蛋白的酶切的两步纯化过程。(B)用考马斯亮蓝染色的SDS-PAGE对GST标签的酶切和无标签的蛋白进行分析。

3. 用凝血酶和GSTrap FF对GST标签的 SH2 结构域进行纯化和柱上酶切。并用与GSTrap串联的HiTrap Bezamidine FF (High sub)柱直接除去凝血酶

如下的应用描述了在1ml GSTrap FF柱上纯化GST-SH2（分子量 37 000），接着用凝血酶进行柱上酶切的过程（图71）。在凝血酶温育步骤后，一根1ml HiTrap Bezamidine FF (High sub)柱串联在GSTrap FF柱后，柱子用结合缓冲液洗涤，然后用高盐缓冲液洗涤。酶切后的SH2蛋白和凝血酶被从GSTrap FF 洗涤到HiTrap Bezamidine FF (High sub)上。凝血酶被第二根柱子捕获，这样就能在洗脱中获得没有凝血酶的纯无标签蛋白（图71A）。用发色底物S-2238（Chromogenix, Haemochrom Diagnostica AB）检测发现已经完全除去凝血酶（图71B）。整个过程可以在一天内结束。

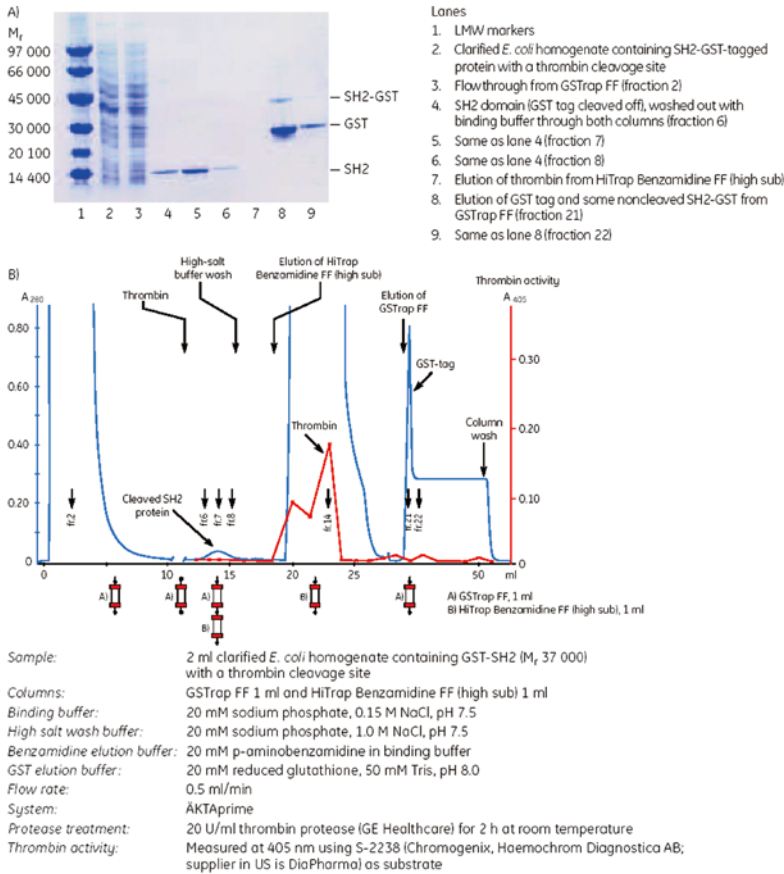


图71：纯化GST-SH2 蛋白并进行柱上酶切。纯化采用GSTrap FF 和HiTrap Bezamidine FF (High sub) 柱。（A）SDS-PAGE分析处理步骤的不同样品，使用ExcelGel 梯度8%-18%，考马斯亮蓝染色。（B）在纯化SH2蛋白时的色谱图和不同步骤中的凝血酶活力。

4. 在GSTrap FF柱上用凝血酶酶切GST标签蛋白

为了说明在纯化时进行柱上酶切的效率，一种含有凝血酶酶切位点的GST标签蛋白上样到GSTrap FF 1ml柱上。洗涤后，柱子用注射器填充入1ml凝血酶溶液（20U/ml，在pH7.3的PBS中），并用提供的接头封住。在室温温育16小时后，除去了GST标签的目的蛋白用pH7.3的PBS洗脱，结合的GST标签在随后用洗脱缓冲液洗脱（图72）。酶切反应完成了100%。在SDS-PAGE检测时用银染没有检测到完整的GST标签蛋白（图72C，第5道）。

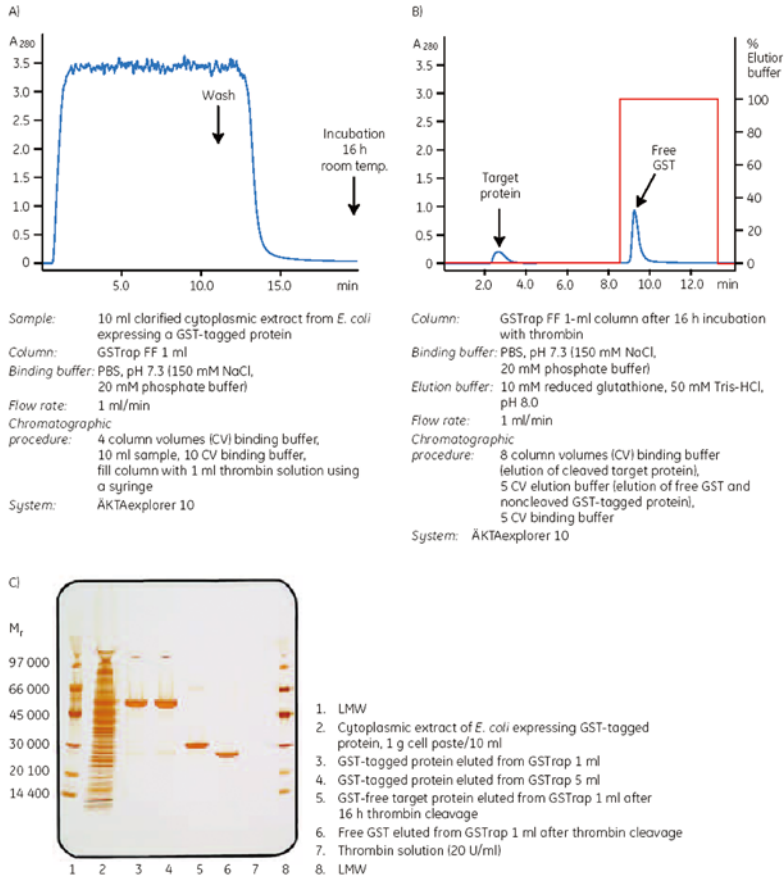


图72：柱上用凝血酶酶切GST标签蛋白。（A）平衡，样品上样，洗涤GST蛋白。纯化是在ÄKTAexplorer 10上的GSTrap 1ml柱子进行的。洗涤后，柱子用注射器填充入1ml凝血酶溶液（20单位/ml，在pH7.3的PBS中）。在室温温育16小时。（B）无GST的目的蛋白用PBS，pH7.3洗脱，GST用10mM谷胱甘肽洗脱。无GST的目的蛋白组分也含有不能被SDS-PAGE检测到的少量凝血酶（第6泳道），凝血酶可以用HiTrap Bezamidine FF (High sub)柱除去。（C）银染的SDS-PAGE分析。

对于从GSTrap FF上洗脱的蛋白进行酶切并纯化

建议使用的缓冲液

结合缓冲液：PBS：140mM 氯化钠，2.7mM 氯化钾，10mM 磷酸氢二钠，1.8mM 磷酸二氢钾，pH7.3

对于Precision Protease酶切：

洗脱缓冲液：50mM Tris-HCl, 10mM 还原型谷胱甘肽，pH8.0

酶切缓冲液：50mM Tris-HCl, 150mM 氯化钠，1mM EDTA, 1mM DTT, pH7.0

Precision Protease

对于凝血酶酶切：

洗脱缓冲液：50mM Tris-HCl, 10mM 还原型谷胱甘肽，pH8.0

酶切缓冲液：PBS：140mM 氯化钠，2.7mM 氯化钾，10mM 磷酸氢二钠，1.8mM 磷酸二氢钾，pH7.3

凝血酶溶液：用0.5ml预冷到4° C的PBS溶解500单位的凝血酶。温柔的混匀。将溶液分装成小份储存在-80° C保持酶活。

对于凝血因子Xa酶切：

洗脱缓冲液：50mM Tris-HCl, 10mM 还原型谷胱甘肽，pH8.0

酶切缓冲液：50mM Tris-HCl, 150mM 氯化钠，2mM 氯化钙，pH7.5

纯化和酶切



如下的方案是为8mg目的蛋白优化过的例子。值得估计上样到柱子上的蛋白量，因为这能使加入的酶量最小化。

1. 用蒸馏水充满注射器，移除塞子，把柱子用提供的Luer接头连接到注射器上，保持接头处有液体，避免向柱子中引入气泡。如果在柱子中发现有气泡，用蒸馏水冲洗，直到气泡消失。
2. 掰掉底部封口。
3. 用3到5个柱体积的蒸馏水洗柱子。
4. 用5个柱体积的结合缓冲液平衡柱子。建议的流速是1ml/min（1ml柱）和5ml/min（5ml柱）。
5. 用注射器或者蠕动泵加入预处理的样品，为了获得最好的结果，在上样时，用0.2到1ml/min（1ml柱子）和0.5到5ml/min（5ml柱子）的流速。
6. 用结合缓冲液洗涤至少5到10个柱体积，直到吸收达到平稳的基线或在流出物中没有物质流出。在洗涤的过程中保持流速为1ml到2ml/min（1ml柱子）和5到10ml/min（5ml柱子）。
7. 用5到10倍柱体积的洗脱缓冲液洗脱GST标签蛋白。在洗涤的过程中保持流速为0.5ml到

1ml/min (1ml柱子) 和1到5ml/min (5ml柱子)。收集洗脱组分 (1ml柱每管收集0.5到1ml, 5ml柱每管收集1到2ml)。合并含有GST标签蛋白的组分 (用280纳米的紫外吸收来检测)。

8. 用HiTrap Desal或HiPrep 26/10脱盐柱除掉游离的还原型谷胱甘肽, 柱子的选择依赖于样品体积。
- 9a. 对于Precision Protease, 向每100微克脱盐后的洗脱物中加入1微升 (2单位) Precision Protease。
- 9b. 对于凝血酶和凝血因子Xa, 向每mg脱盐后的洗脱物中加入10微升 (10单位) 的凝血酶或凝血因子Xa。
- 10a. 对于Precision Protease, 在5度温育4小时。
- 10b. 对于凝血酶和凝血因子Xa, 在室温 (22到25度) 温育2到16小时。



给出的温育的时间只是一个起始条件, 需要根据酶切后目的蛋白的最优产率来改变。

11. 一旦酶切结束, 将样品根据上述步骤 (步骤1到7) 上样到一根预平衡好的GSTrap FF柱上来除去GST标签。

对于Precision Protease

洗脱物中会包含目的蛋白。而GST标签和Precision Protease会仍旧留在GSTrap柱上。这意味着目的蛋白不会污染Precision Protease, 因此不宜需要额外的纯化手段把蛋白酶和目的蛋白分开。

对于凝血酶和凝血因子Xa

洗脱物中会包含有目的蛋白和凝血酶或凝血因子Xa, 然而GST标签会仍旧结合在GSTrap柱上。凝血酶或凝血因子Xa可以通过串联在GSTrap后的HiTrap Bezmidine FF (High sub)柱一步除去。在这个过程中, 酶切后的目的蛋白, 凝血酶或凝血因子Xa被从GSTrap柱上洗涤到HiTrap Bezmidine FF (High sub)柱上。第二步纯化结合了凝血酶或凝血因子Xa, 因此在洗脱物中获得了纯的, 没有蛋白酶的目的蛋白。

用于随后纯化的GSTrap柱再生细节请参见附录2。

批量模式下酶切和纯化结合在Glutathione Sepharose上的GST标签蛋白

建议使用的缓冲液

Glutathione Sepharose High Performance、Glutathione Sepharose 4 Fast Flow和Glutathione



Sepharose4B都能用于批量酶切和纯化GST标签蛋白。

结合缓冲液: PBS: 140mM 氯化钠, 2.7mM 氯化钾, 10mM 磷酸氢二钠, 1.8mM 磷酸二氢钾, pH7.3

对于Precision Protease酶切:

洗脱缓冲液: 50mM Tris-HCl, 10mM 还原型谷胱甘肽, pH8.0

酶切缓冲液： 50mM Tris-HCl, 150mM 氯化钠, 1mM EDTA, 1mM DTT, pH7.0

Precision Protease

对于凝血酶酶切:

洗脱缓冲液： 50mM Tris-HCl, 10mM 还原型谷胱甘肽, pH8.0

酶切缓冲液： PBS: 140mM 氯化钠, 2.7mM 氯化钾, 10mM 磷酸氢二钠, 1.8mM 磷酸二氢钾, pH7.3

凝血酶溶液： 用0.5ml预冷到4° C的PBS溶解500单位的凝血酶。温柔的混匀。将溶液分装成小份储存在-80° C保持酶活。

对于凝血因子Xa酶切:

洗脱缓冲液： 50mM Tris-HCl, 10mM 还原型谷胱甘肽, pH8.0

酶切缓冲液： 50mM Tris-HCl, 150mM 氯化钠, 2mM 氯化钙, pH7.5

准备Glutathione Sepharose柱的介质和蛋白的结合

Glutathione Sepharose介质溶胀储存在20%的乙醇中。介质以50%浓度的悬浊液使用。

1. 确定纯化所需的Glutathione Sepharose介质的柱床体积。
2. 温和摇晃瓶子使介质重悬。
3. 用移液枪或量筒量取适当体积的介质放入合适的容器中。
4. 500g离心5min使介质沉降, 小心去除上清。
5. 每ml (含有50%的柱材) Glutathione Sepharose HP、FF或4B介质加入5ml PBS漂洗。
 Glutathione Sepharose介质必须用PBS彻底漂洗以除去贮存液中的乙醇, 痕量的乙醇可能会影响后续的实验。
6. 500g离心5min使介质沉降, 小心去除上清。
7. 再次重复步骤5和6一次。
8. 将细菌裂解物加入准备好的Glutathione Sepharose, 在室温至少温育30分钟。温柔的搅动, 比如上下颠倒旋转。

纯化和酶切



假设每ml介质结合8mgGST标签蛋白。

1. 用10倍柱体积的酶切缓冲液洗涤标签蛋白结合着的Glutathione Sepharose介质。柱床体积为 $0.5 \times$ 使用的50% Glutathione Sepharose介质悬浊液体积。
 - 2a. 准备Precision Protease混合物:
对于每mlGlutathione Sepharose介质, 在5° C将80 μ l (160单位) Precision Protease混合到920 μ l的Precision Protease酶切缓冲液中。
 - 2b. 准备凝血酶混合物:
对于每mlGlutathione Sepharose介质, 将80 μ l (80单位) 凝血酶混合到920 μ l的凝血酶酶切缓冲液中。

2c. 准备凝血因子Xa混合物:

对于每ml Glutathione Sepharose 介质, 将80 μ l (80单位) 凝血因子Xa混合到920 μ l的凝血因子Xa酶切缓冲液中。

3. 将蛋白酶混合物加入到Glutathione Sepharose介质中, 温柔的震荡或上下颠倒旋转悬浊物。

4a. 对于Precision Protease, 在5° C温育4小时。

4b. 对于凝血酶和凝血因子Xa, 在室温 (22-25° C) 温育2-16小时。

给出的温育的时间只是一个起始条件, 需要根据酶切后目的蛋白的最优产率来改变。

5. 温育后, 用大约3倍柱体积洗脱无标签蛋白。将悬浊液用500 $\times$ g离心5分钟来沉淀 Glutathione Sepharose 介质, 仔细地将洗脱物转移到管中。

对于Precision Protease

洗脱物中会包含目的蛋白。而GST标签和Precision Protease会仍旧留在Glutathione Sepharose介质上。这意味着目的蛋白不会污染Precision Protease, 因此不需要额外的纯化手段把蛋白酶和目的蛋白分开。

对于凝血酶和凝血因子Xa

洗脱物中会包含有目的蛋白和凝血酶或凝血因子Xa, 然而GST标签会仍旧结合在 Glutathione Sepharose 介质上。凝血酶或凝血因子Xa可以通过HiTrap Beazamidine FF (High sub)柱除去。HiTrap Beazamidine FF (High sub)柱结合了凝血酶或凝血因子Xa, 因此在洗脱物中获得了纯的没有蛋白酶的目的蛋白。

用HiTrap Beazamidine FF (High sub)柱除去凝血酶和凝血因子Xa

需要的试剂

结合缓冲液: 0.05M Tris-HCl, 0.5M 氯化钠, pH7.4

用于洗脱蛋白酶的洗脱缓冲液的不同配方:

0.05M Glycine-HCl, pH3.0

10mM HCl, 0.5M 氯化钠, pH 2.0

向结合缓冲液中添加20mM p-Aminobenzamidine (竞争性洗脱)

8M尿素或6M盐酸胍 (变性剂溶液)



建议的流速是1ml/min (1ml柱) 和5ml/min (5ml柱)

1. 用蒸馏水充满注射器, 移除塞子, 把柱子用提供的Luer接头连接到注射器上, 保持接头处有液体, 避免向柱子中引入气泡。如果在柱子中发现有气泡, 用蒸馏水冲洗, 直到气泡消失。
2. 掰掉底部封口。
3. 用5个柱体积的蒸馏水洗柱子以除去储存缓冲液 (0.05M醋酸,pH4,含有20%乙醇)。

4. 用5倍柱体积的结合缓冲液平衡柱子。
5. 用连接了Luer接头的注射器或蠕动泵上样。建议的上样流速是1ml/min（1ml柱）和5ml/min（5ml柱）。收集穿透并保存。其中含有需要保存的除去了蛋白酶的物质。加入一个小体积的结合缓冲液用来收集从柱子流出的所有需要的物质。
6. 用5到10个柱体积的结合缓冲液洗涤，收集组分。1ml柱子每管收集0.5到1ml，5ml柱每管收集1到3ml。直到洗脱物中没有物质流出（用280纳米的紫外吸光检测）。
7. 合并穿透和洗脱中含有无凝血酶和凝血因子Xa的目的蛋白组分（用280纳米的紫外吸光检测）。
8. 对于柱子的重新使用，用所选择的5到10个柱体积洗脱缓冲液也洗脱结合着的蛋白酶。如果洗脱后的凝血酶和凝血因子Xa需要重复使用，则用HiTrap Desalting 或PD-10 Desalting柱交换缓冲液。如果使用低pH洗脱缓冲液，则在收集管中预先加入中和缓冲液。
9. 在所有的蛋白酶都被洗脱后，用结合缓冲液洗涤柱子，柱子可以用于下一次纯化。



如果使用低pH洗脱，将每ml蛋白酶组分收集到含有60-200μl的中和缓冲液（1M Tris-HCl，pH9.0）的管子中。保证收集的组分的最终pH大概接近中性。



凝血酶活力可以用小份的组分以S-2238（Chromogenix, Haemochrom Diagnostica AB）为底物在405nm测量吸光值。

酶切方法的问题解决

下述的问题解决指导针对酶切方法中经常出现的问题以及特定的方法可能存在的问题，后一种情况中有相应方法的说明。

问题	可能原因	解决方法
GST标签蛋白没有被完全切割	Precision Protease，凝血酶，凝血因子Xa，与GST标签蛋白的比例并非最佳。	检查酶切反应中标签蛋白的量。注意，Glutathione Sepharose High performance介质和Glutathione Sepharose Fast Flow介质的GST载量约为10mg/ml，Glutathione Sepharose 4B介质的载量约为5mg/ml。然而，在大多数纯化中，柱子并未被标签蛋白饱和。确认使用了正确的蛋白酶对标签蛋白的比例，如果需要的话进行调整。对于Precision Protease和凝血酶，每mg蛋白至少使用10个单位。对于凝血因子Xa，至少使用目的蛋白的1%（w/w）。对于有些标签蛋白，需要使用多达5%的凝血因子Xa。最优的比例需要根据实验决定。某些条件下，最优的结果可在目的蛋白为1mg/ml的浓度下获得。对于某些标签蛋白，在反应缓冲液中加入终浓度为0.5%(w/v) SDS能够显著的提高凝血因子Xa的切割效率。需要尝试不同的SDS浓度来决定最佳的浓度。
	温育时间和/或酶浓度不足够进行GST标签的完全酶切。	对于酶切反应，增加温育时间。只要目的蛋白没有被延长的温育时间导致降解，则增加反应时间到20小时或更多，应该能够提高酶切效果。或者尝试增加用于酶切的酶的量。
	在克隆标签蛋白时，蛋白酶识别的特异位点被改变了。	确认存在特异的蛋白酶切位点。检查克隆的DNA序列，和已知的序列进行比较来验证酶切位点没有被改变。
	存在有蛋白酶抑制剂干扰酶切反应	除去任何能够干扰酶切反应的蛋白酶抑制剂。在用Precision Protease酶切前，将标签蛋白更换或透析到50mM Tris-HCl, 150mM 氯化钠，1mM EDTA,1mM DTT，pH7.5中。在用凝血因子Xa切割前，将标签蛋白根据体积选用HiTrap Desalting，PD-10 Desalting或HiPrep 26/10 Desalting脱盐柱或透析交换缓冲液到50mM Tris-HCl, 150mM 氯化钠，1mM 氯化钙，pH7.5中。
	凝血因子Xa没有正确的被激活	用Russell’s 蛇毒来激活凝血因子Xa，以使其转变为有功能的酶。为了激活凝血因子Xa，将Russell’s 蛇毒和凝血因子以1% 的比例在8mM Tris-HCl, 70mM 氯化钠，8mM 氯化钙,pH8.0的缓冲液中混合。37° C温育5分钟。GE Healthcare提供的凝血因子Xa已经被该步骤激活了。

	凝血因子Xa识别的序列后第一个氨基酸是Arg或Pro。	检查标签蛋白的序列，确认凝血因子Xa识别序列后的前三个核苷酸不编码Arg或Pro。
酶切的目的蛋白经过SDS-PAGE检测或蛋白质免疫印迹检测发现有多条条带	在酶切反应前，在宿主细胞中已经发生了降解	确认何时出现了多余的条带。确认多余的条带在Precision Protease，凝血酶，或凝血因子Xa酶切前不存在。
	标签蛋白自身含有能够被Precision Protease，凝血酶，或凝血因子Xa的识别序列。	检查标签蛋白的序列，确认其是否含有用于酶切的蛋白酶识别位点。
标签蛋白在纯化后污染了蛋白酶	Glutathione Sepharose介质在纯化过程中可能被饱和了	将样品通过一根新的GSTrap柱或新鲜的Glutathione Sepharose介质除去残存的Precision Protease，或通过一根HiTrap Bezmidine FF (High sub)柱来去除凝血酶，或凝血因子Xa。

第6章 MBP标记的重组蛋白的纯化

Dextrin Sepharose High Performance是用来纯化麦芽糖结合蛋白（MBP）标记的重组蛋白的色谱柱料。使用MBP标记蛋白经常可以增加靶蛋白的表达水平，增加蛋白的溶解性。MBP标签还可以增加标记蛋白的正确折叠。当标记蛋白过表达时，可以降低获得包涵体的危险。

使用Dextrin Sepharose High Performance进行亲和纯化，可以在生理条件下进行，使用麦芽糖在温和条件下进行洗脱。这种温和的洗脱条件保护了靶蛋白的活性。即使是完整的蛋白复合物也可以被纯化。此外，高结合能力和高结合特异性，意味着仅使用一步就可以获得高得率的高纯度蛋白。

Dextrin Sepharose High Performance有适合实验室使用的25毫升和100毫升的包装，以及预装的1毫升和5毫升的MBPTrap HP柱子。



图6.1 Dextrin Sepharose High Performance，以及预装的MBPTrap HP柱子，可以用来快速、方便的亲和纯化MBP标记的重组蛋白。

使用Dextrin Sepharose High Performance进行纯化

Dextrin Sepharose High Performance是基于34微米Sepharose High Performance构建的刚性的、高分辨率的色谱柱料。微小、均匀体积的珠子确保了MBP标记的蛋白在窄的峰进行洗脱，这样就将进一步浓缩的需要进行了最小化。Dextrin Sepharose High Performance耐受所有经常使用的液体缓冲液，使用0.5摩氢氧化钠很容易进行再生，这样就可以使用相同的柱子进行重复纯化。表A3.1（参见附录3）总结了Dextrin Sepharose High Performance的特性。

装柱

参考附录6获得装柱的一般性指导原则。

Dextrin High Performance在20%乙醇中以预溶胀的形式提供。倾倒除去20%的乙醇溶液，制备柱料浆液，按照75%固定柱料和25%蒸馏水的比例，使用蒸馏水进行替代。水用作装柱溶液。

表6.1 推荐的适合实验室规模使用的Dextrin Sepharose High Performance柱子

空柱子1	装柱流速2 (毫升/分钟) 第一步	第二步	推荐的色谱流速2 (毫升/分钟)
Tricorn 5/20	0.5	1	0.5
Tricorn 5/50	0.5	1	0.5
Tricorn 10/20	2	4	2
Tricorn 10/50	2	4	2
Tricorn 10/100	2	4	2
XK 16/20	5	10	5
XK 26/20	13	27	13

1 如果需要获取内径、最大柱床体积和柱床高度的信息，参见附录6。

2 推荐的流速相当于大约150厘米/小时的线性流速。

1. 安装柱子（如果需要，同时安装装柱容器）。
 2. 通过用水冲刷去除末端和适配器中的气泡。确保没有气泡在柱子柱床支持物下面截留。关闭柱子出口，保持柱床支持物为水覆盖。
 3. 重悬色谱柱料，单独一次连续动作将柱料浆液倒入柱子。沿着靠在柱子壁上的玻璃棒向下倾倒柱料浆液，可以将引入气泡的机会最小化。
 4. 如果使用装柱容器，立即将柱子的剩余空间和装柱容器用水充满。将装柱容器的适配器或盖子装好，将柱子与泵进行连接。避免在适配器下或入口管内截留气泡。
 5. 打开柱子底部出口，根据需要设定泵的运行流速；参见表6.1或下面。推荐使用两步程序在XK或Tricorn柱子进行Sepharose High Performance色谱柱料装柱。在第一步不要超出1.0巴（0.1兆帕），在第二步不要超出3.5巴（0.35兆帕）。

注意：后续的色谱步骤，不要超过75%的装柱流速。参见表6.1获取色谱流速的相关信息。

-  如果装柱设备没有含有压力计，在第一步装柱流速使用5毫升/分钟（XK 16/20柱子）或2毫升/分钟（Tricorn 10/100柱子），在第二步装柱流速使用9毫升/分钟（XK 16/20柱子）或3.6毫升/分钟（Tricorn 10/100柱子）。参见表6.1获取其它柱子装柱流速的相关信息。

 如果不能达到推荐的压力或流速，使用你的泵可以提供的最大流速。这也会提供很好的装柱效果。

6. 柱床高度恒定后，保持装柱流速，至少三倍柱床体积。在柱子上标记柱床高度。
7. 停止泵的运行，关闭柱子出口。
8. 如果使用装柱容器，拆下装柱容器，将适配器连接柱子。
9. 取下适配器进口，将适配器向下推进到柱子，直到标记位置。允许装柱溶液淹没适配器进口。将适配器锁在合适的位置。
10. 将柱子连接到泵或者色谱系统，开始平衡，如果需要重新调整适配器。

样品制备

-  调整样品的组成与结合缓冲液（参见下面）相同。例如，使用结合缓冲液稀释样品，或者使用除盐柱进行缓冲液交换（参见第11章）。
-  在柱子上样前，立即使用0.22微米或者0.45微米的滤器和/或离心机处理品。如果样品太粘稠，为了防止堵塞柱子，使用结合缓冲液进行稀释，增加裂解处理（超声、匀浆），或者加入DNase/RNase减少核酸片断的大小。

缓冲液制备

结合缓冲液:	20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4
可以选择性添加:	1 mM DTT
洗脱缓冲液:	结合缓冲液中含有10 mM麦芽糖
再生缓冲液:	0.5 M NaOH (参见附录3)或者0.1% SDS

-  缓冲液制备使用的水和化学试剂应该是高纯度的。使用前使用0.22微米或者0.45微米的滤器过滤缓冲液。

纯化

推荐的线性流速是150厘米/小时。

1. 拿掉塞子，将柱子和系统进行连接。避免在柱子中引入气泡。
2. 如果柱子在20%乙醇中储存，使用至少5倍柱子体积（CV）的蒸馏水，或者使用线性流速是50到100厘米/小时的结合缓冲液，洗去乙醇。
3. 使用至少5倍柱子体积的结合缓冲液平衡柱子。
4. 将已经进行预处理的样品上样。为了优化性能，在样品上样过程中使用较低的流速。
5. 使用5到10倍柱子体积的结合缓冲液进行清洗，或者直到在流出物中没有材料出现。
6. 使用5倍柱子体积的洗脱缓冲液进行洗脱。可以使用预装的除盐柱（参见第11章），调整洗脱组分的缓冲液条件。
7. 洗脱之后，按照附录3描述的流程，进行柱子的再生。

- 规模放大时，一般保持柱床高度和线性流速（厘米/小时）不变，而增加柱床的直径和体积流速（毫升/分钟）。参见图6.7获得使用此柱料规模放大的例子。
- 将Dextrin Sepharose High Performance保存在20%乙醇内，置于4摄氏度到8摄氏度。储存后，使用前应用结合缓冲液进行平衡。

使用MBPTrap HP柱子进行纯化

MBPTrap HP 1毫升和5毫升的柱子是用生物兼容的聚丙烯制造，与生物分子没有相互作用。预装的MBPTrap HP柱子凭借方便的设计可以提供快速、简单和容易的分离。这些柱子可以与注射器、实验室泵、或者象ÅKTA design这样的色谱系统连用进行分离。

MBPTrap HP柱子供应时，在进口处有塞子，在出口处有snap-off末端。多孔的顶部和底部玻璃陶瓷材料耐受高流速。MBPTrap HP柱子属于预装柱HiTrap家族。注意HiTrap柱子不能被打开或者重装。

表A 3.2（参见附录3）总结了预装MBPTrap HP柱子的特性。



图6.2 MBPTrap HP1毫升和5毫升的柱子，可以快速方便的亲和纯化带有MBP标签的重组蛋白。

样品制备

调整样品的组成与结合缓冲液（参见下面）相同。例如，使用结合缓冲液稀释样品，或者使用除盐柱进行缓冲液交换（参见第11章）。

在柱子上样前，立即使用0.22微米或者0.45微米的滤器和/或离心机处理品。如果样品太粘稠，为了防止堵塞柱子，使用结合缓冲液进行稀释，增加裂解处理（超声、匀浆），或者加入DNase/RNase减少核酸和片断的大小。

缓冲液制备

结合缓冲液：20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4

可以选择性添加：1 mM DTT

洗脱缓冲液：结合缓冲液中含有10 mM麦芽糖

再生缓冲液：0.5 M NaOH (参见附录3)或者0.1% SDS



缓冲液制备使用的水和化学试剂应该是高纯度的。使用前使用0.22微米或者0.45微米的滤器过滤缓冲液。

纯化

1. MBPTrap HP柱子可以与注射器、实验室泵、或者象ÄKTA design这样的色谱系统连用进行分离。
2. 使用结合缓冲液将注射器或者泵的管道充满。移走塞子，“一滴滴”将柱子与注射器或者泵的管道相连（使用提供的连接头），这样可以避免在柱子中引入气泡。
3. 移走柱子出口处的snap-off末端。使用至少5倍柱体积（CV）的蒸馏水或者结合缓冲液清洗掉乙醇。
4. 使用至少5倍柱体积的结合缓冲液平衡柱子，对于1毫升或者5毫升的柱子，分别使用1毫升/分钟或者5毫升/分钟的流速。
5. 将注射器安装在Luer接头，或将泵连接在柱子上*，进行样品的上样。
6. 使用5到10倍柱体积的结合缓冲液进行清洗，直到在洗脱液中没有材料出现。
7. 使用5倍柱体积的洗脱缓冲液进行洗脱。洗脱的组分可以使用预装的除盐柱进行缓冲液交换（参见第11章）。
8. 洗脱之后，按照附录3描述的流程，进行柱子的再生。

* 为了获得最佳的性能，在上样过程中，可以使用低一些的流速（1毫升或者5毫升的柱子分别使用0.5毫升/分钟或者2.5毫升/分钟）。流速和液滴数之间的关系是：当使用连接HiTrap 1毫升柱子的注射器时，0.5毫升/分钟的速度近似对应于15滴/分钟；而当使用HiTrap 5毫升的柱子时，2.5毫升/分钟的速度近似对应于60滴/分钟。



通过增加样品上样量和增加流速五倍，从1毫升到5毫升MBPTrap HP柱子的规模扩大很容易进行。另外一种快速规模扩大的方法是，依次串联连接两个或者三个MBPTrap HP柱子（后压力会增加）。参见图6.7获得使用这种柱料进行规模扩大的例子。



MBPTrap HP柱子可以快速处理样品，使用0.5 M氢氧化钠很容易进行清洁。



将MBPTrap HP柱子保存在20%乙醇内，置于4摄氏度到8摄氏度。储存后，使用前应用结合缓冲液进行平衡。

应用实例

1. 应用ÄKTAexpress进行自动两步纯化

在ÄKTAexpress上进行自动化两步纯化，使用MBPTrap HP1毫升作为第一步亲和纯化步骤。第二步，凝胶过滤使用HiLoad 16/60 Superdex 200皮克运行。MBP2*-副肌球蛋白- δ -Sal (相对分子量大约70 000)，在溶液中以多聚体的形式存在，从E. coli裂解液中进行纯化。图6.3显示自动化纯化的运行条件和色谱结果。两步之后的最终总产量是2.16毫克，总共的运行时间仅仅为3.4小时。图6.4的SDS-PAGE分析显示，来自最终凝胶过滤步骤合并的组分具有很高的纯度。

亲和色谱柱子:	MBPTrap HP 1 ml
样品:	含有MBP2*-副肌球蛋白- δ -Sal (相对分子量大约70 000)的E. coli裂解液
样品体积:	7 ml
流速:	1.0 ml/min (样品上样过程中0.5 ml/min)
结合缓冲液:	20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7.4
洗脱缓冲液:	结合缓冲液中含有10 mM 麦芽糖
凝胶过滤柱子:	HiLoad 16/60 Superdex 200 pg, 120 ml
样品:	从MBPTrap HP 1 ml的洗脱混合物
流速:	1.5 ml/min
缓冲液:	10 mM sodium phosphate, 140 mM NaCl, pH 7.4
系统:	ÄKTAexpress

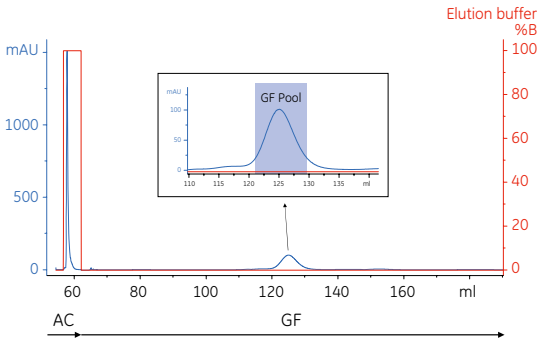
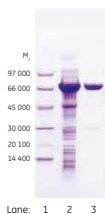


图6.3 使用两步亲和色谱-凝胶过滤操作流程，应用MBPTrap HP 1 ml（亲和色谱）和HiLoad 16/60 Superdex 200 pg（凝胶过滤），自动纯化MBP2*-副肌球蛋白- δ -Sal。



泳道

1. 低分子量标志物, LMW
2. 起始材料, 含有MBP2*-副肌球蛋白- δ -Sal的E. coli裂解液
3. 洗脱的凝胶过滤混合物

图6.4 MBP2*-副肌球蛋白- δ -Sal纯化的SDS-PAGE分析（还原状态）

2. 参与代谢疾病的蛋白的简单纯化

在介质链脂酰辅酶A脱氢酶(medium-chain acyl-CoA dehydrogenase, MCAD)的纯化程序中, 使用MBPTrap HP柱子消除了浓缩步骤。该蛋白是同源四聚体(相对分子量85 500), 参与代谢疾病, 被纯化来进行稳定性、折叠和动力学研究(参见图6.5)。在此纯化步骤中, MBPTrap HP 5毫升柱子代替先前使用的相同应用的亲和色谱步骤。MBPTrap HP柱子上洗脱的靶蛋白加倍浓缩, 体积更小。随后, 先前需要的在最终凝胶过滤之前的浓缩步骤可以避免, 这样造成的结果是, 全部纯化程序可以在一天内完成, 而不再是两天。

来自MBPTrap HP和凝胶过滤的洗脱组分的纯度使用SDS-PAGE分析进行了测定。在亲和步骤之后, 靶蛋白之外的一些多余蛋白被检测到。这可能是因为仍然带有N-末端MBP完整标签的剪切突变体的存在, 或者可能是和靶蛋白结合的E. coli蛋白(还有待进一步评估)。根据SDS-PAGE分析(参见图6.6), 在凝胶过滤之后的最终纯度很高(大于95%)。最终产率近似8.4毫克MCAD。浓缩步骤的消除增加了靶蛋白的收率, 减少了总的纯化时间。

柱子: MBPTrap HP 5 ml
样品: 含有N-末端 MBP-MCAD的E. coli裂解液
样品体积: 15 ml
流速: 5.0 ml/min(样品上样过程中0.5 ml/min)
结合缓冲液: 20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7.4
洗脱缓冲液: 结合缓冲液中含有10 mM 麦芽糖
系统: ÄKTApurime

柱子: Superdex 200 pg in XK 16/20
样品: 从MBPTrap HP 5 ml的洗脱混合物
样品体积: 2 ml
流速: 0.4 ml/min
缓冲液: 20 mM HEPES, 200 mM NaCl, pH 7.0
系统: ÄKTApurime

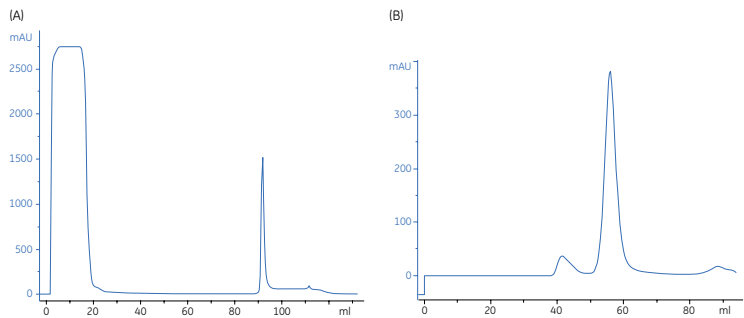
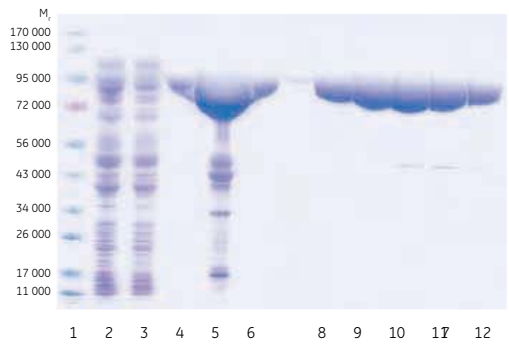


Fig 6.5. 应用 (A) MBPTrap HP连着 (B) Superdex 200 pg进行MCAD的纯化。



泳道

1. 分子量标志物
2. 起始材料, 在E. coli裂解液中的N-末端 MBP-MCAD , 6倍稀释
3. MBPTrap HP的穿透液, 6倍稀释
- 4-6. 从MBPTrap HP的洗脱组分
- 7-12. 从凝胶过滤Superdex 200 pg的洗脱组分

Fig 6.6. 来自MCAD两步纯化组分的SDS-PAGE分析 (还原状态)。数据由德国慕尼黑的Esther M. Maier博士和von Haunersches Kinderspital博士惠赠。

3. 规模放大

可以通过增加柱床体积而保持阻滞时间恒定，进行规模扩大。在规模放大过程中，这种方法保证了色谱的性能。MBP2*-β-半乳糖苷酶(相对分子量大约~158 000)，一种带有亲和和标签的多聚物，使用ÅKTAexplorer上的MBPTrap HP1毫升柱子进行了纯化。规模放大的纯化在MBPTrap HP5毫升和装有Dextrin Sepharose High Performance的XK 26/20柱子进行。蛋白上样量每一步依次增加了五倍（分别大约为10，50，250毫克），对于所有的三根柱子阻滞时间大约是两分钟。图6.7显示所有分离的运行条件，以及MBPTrap HP1毫升和Dextrin Sepharose High Performance XK 26/20柱子运行的色谱图。图6.8显示了SDS-PAGE结果。这些柱子得出了具有可比性的结果，都具有高纯度和相似的产率（近似60%，表6.2），验证了从MBPTrap HP柱子到XK 26/20柱子规模放大纯化的简便性和重复性。另外一种进行快速规模放大的方法是依次连接两或三根MBPTrap HP柱子，但是这样会增加后压力。

表6.2 规模放大，产量计算单位为毫克和百分比

柱子	产量（毫克）	产量（%）
MBPTrap HP 1毫升	6.4	64
MBPTrap HP 5毫升	29.5	59
装有 Dextrin Sepharose High Performance的XK 26/20，29毫升	141.4	57

柱子: MBPTrap HP 1 ml
装有Dextrin Sepharose High Performance 的XK 26/20, 29 ml, 柱床高度5.5 cm

样品: 含有MBP2*- β -半乳糖苷酶(Mr ~158 000) 的E. coli裂解液

样品体积: 5 ml (MBPTrap HP 1 ml)
125 ml (XK 26/20 column)

结合缓冲液: 20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7.4

洗脱缓冲液: 结合缓冲液中含有10 mM麦芽糖

流速: MBPTrap HP 1 ml: 1.0 ml/min (样品上样过程中0.5 ml/min)
XK 26/20 柱子: 13 ml/min

系统: ÄKTAexplorer

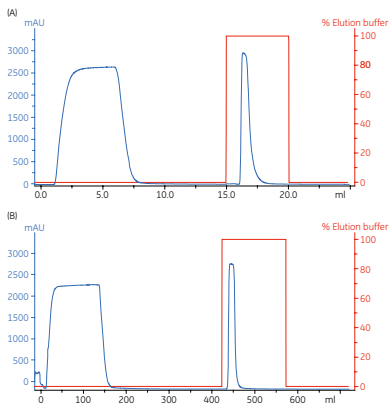


图6.7 MBP2*- β -半乳糖苷酶纯化的规模放大，（A）MBPTrap HP 1 ml毫升，（B）Dextrin Sepharose High Performance 的XK 26/20，29毫升。MBPTrap HP 5 ml毫升柱子的色谱图没有显示。

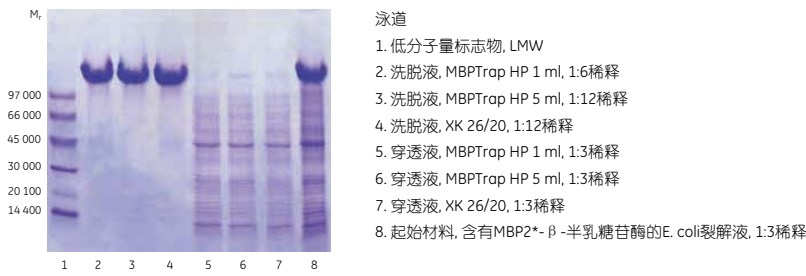


图6.8 SDS-PAGE分析（还原状态）进行规模放大研究。

问题解答

问题	可能原因	解决方法
增加后压力	溶液高粘度。 细胞破碎不充分。	使用较低流速和/或稀释样品。 增加机械性细胞破碎的效率，如增加超声时间。（超声时将样品放置在冰上，避免起泡和过热，因为这样会使靶蛋白变性。过度超声会引起宿主蛋白和靶蛋白的共纯化）。 在机械性裂解之前，增加细胞浆的稀释程度，或者裂解之后进行稀释降低黏度。 如果由于宿主的核酸浓度高造成的裂解液非常粘，连续超声直到粘度降低，和/或加入另外的DNase。此外，可以用注射器针头吹打裂解液几次。 如果纯化在4摄氏度进行，如果可能，尝试在室温重复纯化过程（室温条件下样品的粘度降低）。 样品上样过程中降低流速。
	未澄清的裂解液反复冻融会增加沉淀和聚集体。 顶部的滤器堵塞。	在柱子上样之前，离心或使用0.22或0.45微米的滤器进行过滤。 更换顶部的滤器。如果使用MBPTrap柱子，更换柱子。
柱子堵塞	样品中细胞残骸可能堵塞了柱子。	按照附录3清洁柱子。在柱子上下一个样品之前，离心和/或使用0.22或0.45微米的滤器过滤样品，或别的优化的样品预处理方式。
与柱子没有结合或结合弱	穿透液出现了蛋白。 粗提物中含有干扰结合的因子。 没有MBP-标签。 MBP-标签没有用。	缓冲液/样品成分不理想；检查样品和结合缓冲液的pH值和组成成分。pH一般应高于7。 包括抑制淀粉酶表达的生长培养基中的葡萄糖。 使用蛋白酶缺陷的E. coli表达株。在细胞裂解过程中加入蛋白酶抑制剂。 将MBP-标签和另一个蛋白末端进行融合。使用另一个连接。

问题	可能原因 由于高蛋白浓度，蛋白在柱子上沉淀。	解决方法 按照附录3的指导清洁柱子。在下面的运行中，通过线性梯度洗脱，而不是step-wise洗脱，降低样品的数量，或者降低蛋白的浓度。尝试去污剂或改变氯化钠的浓度。 如果使用MBPtrap HP 1毫升的柱子，更换为更大的MBPtrap HP 5毫升的柱子。如果使用相同数量的样品，这会降低最终浓度。对于快速规模放大，通过将一个柱子的末端螺纹连接到下一个的顶部，依次连接两个或者更多个柱子。然而，必须注意的是，依次连接柱子会增加后压力。
污染的蛋白	污染是靶蛋白的截短形式。 污染物是通过二硫键共价连接到重组蛋白的。 污染物是通过非共价键连接到重组蛋白的。	使用蛋白酶缺陷的E. coli表达株。在细胞裂解后加入蛋白酶抑制剂。将MBP-标签和其它蛋白末端进行融合。检查内部翻译起始位点（对于C末端MBP-标签）或提前的终止位点（对于N末端MBP-标签）。在样品和缓冲液中使用EDTA。保持样品的低温状态。 在所有的细胞裂解和纯化缓冲液中加入还原剂。注意产量可能降低。 在所有的细胞裂解和纯化缓冲液增加离子强度（高达1摩氯化钠）或者加入温和的去污剂（0.1% Triton X-100, 0.1% Tween, 0.1% CHAPS）。小心加入非离子去污剂之后，MBP结合到dextrin的能力会受到影响。
不希望的气泡形成	未澄清的裂解液可能增加纯化过程中的气泡形成。 当柱子保存在4摄氏度到8摄氏度，而在室温立即使用时，由于降低了气体的溶解性，可能产生气泡。	在色谱系统中连接流速限制器可以阻止的气泡形成。如果连接了流速限制器，重要的是改变压力限制，来调整流速限制器产生的额外压力。不要超出ÄKTAdesign系统上柱子的压力限制。 在柱子使用前，先在室温放置数分钟，让柱子温度平衡到室温。

第七章 Strep-tag II重组蛋白的纯化

StrepTactin Sepharose High Performance是纯化Strep-tag II蛋白的色谱柱料。Strep-tag II是仅含有八个氨基酸残基(Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys)的小标签，相对分子量(Mr)仅为1000。标签的小体积是有利的，因为在大多数情况下，它不会干扰结构和功能研究，因此，纯化之后不需要从靶蛋白上移除。Strep-tag II非常特异的结合到固定的StrepTactin配基上，在纯化之后产生纯的蛋白。使用StrepTactin Sepharose High Performance进行亲和纯化，纯化过程在生理条件下进行，使用脱疏生物素进行温和洗脱，保护了靶蛋白的活性。

StrepTactin Sepharose High Performance有适合实验室使用的10毫升和50毫升的包装，以及预装的1毫升和5毫升的StrepTrap HP柱子。



图7.1 StrepTactin Sepharose High Performance，以及预装的StrepTrap HP柱子，可以用来快速、方便的亲和纯化Strep-tag II标记的重组蛋白。

使用StrepTactin Sepharose High Performance进行纯化

StrepTactin是专门设计的streptavidin配基。Strep-tag II与固定配基的结合亲和性比与链霉亲和素的高接近100倍，使得StrepTactin Sepharose High Performance进行Strep-tag II蛋白的纯化非常理想。

Sepharose High Performance柱料微小的珠子体积(平均34微米)可以进行高分辨率分离，窄的峰，以浓缩形式纯化靶蛋白。StrepTactin Sepharose High Performance与广泛范围的添加物兼容，耐受所有经常使用的液体缓冲液，使用0.5摩氢氧化钠很容易进行快速和简单的再生。参见附录4获得柱料特性的更多信息。

StrepTactin Sepharose High Performance在10毫升和50毫升包装中以预溶胀的形式提供。柱料容易装柱和使用，例如，在Tricorn和XK系列的实验室柱子上(参见表7.1)。

装柱

参考附录6获得装柱的一般性指导原则。

StrepTactin High Performance在20%乙醇中以预溶胀的形式提供。倾倒除去20%的乙醇溶液，制备柱料浆液，按照75%固定柱料和25%蒸馏水的比例，使用蒸馏水进行替代。水用作装柱溶液。

表7.1 推荐的适合实验室规模使用的StrepTactin Sepharose High Performance柱子

空柱子1	装柱流速2 (毫升/分钟) 第一步	第二步	推荐的色谱流速2 (毫升/分钟)
Tricorn 5/20	0.5	1	0.5
Tricorn 5/50	0.5	1	0.5
Tricorn 10/20	2	4	2
Tricorn 10/50	2	4	2
Tricorn 10/100	2	4	2
XK 16/20	5	10	5
XK 26/20	13	27	13

1 如果需要获取内径、最大柱床体积和柱床高度的信息，参见附录6。

2 推荐的流速相当于大约150厘米/小时的线性流速。

1. 安装柱子（如果需要，同时安装装柱容器）。
 2. 通过用水冲刷去除末端和适配器中的气泡。确保没有气泡在柱子柱床支持物下面截留。关闭柱子出口，保持柱床支持物为水覆盖。
 3. 重悬色谱柱料，单独一次连续动作将柱料浆液倒入柱子。沿着靠在柱子壁上的玻璃棒向下倾倒柱料浆液，可以将引入气泡的机会最小化。
 4. 如果使用装柱容器，立即将柱子的剩余空间和装柱容器用水充满。将装柱容器的适配器或盖子装好，将柱子与泵进行连接。避免在适配器下或入口管内截留气泡。
 5. 打开柱子底部出口，根据需要设定泵的运行流速；参见表7.1或下面。推荐使用两步程序：在XK或Tricorn柱子进行Sepharose High Performance色谱柱料装柱。在第一步不要超出1.0巴（0.1兆帕），在第二步不要超出3.5巴（0.35兆帕）。

注意：后续的色谱步骤，不要超过75%的装柱流速。参见表7.1获取色谱流速的相关信息。

 如果装柱设备没有含有压力计，在第一步装柱流速使用5毫升/分钟（XK 16/20柱子）或2毫升/分钟（Tricorn 10/100柱子），在第二步装柱流速使用9毫升/分钟（XK 16/20柱子）或3.6毫升/分钟（Tricorn 10/100柱子）。参见表7.1获取其它柱子装柱流速的相关信息。

 如果不能达到推荐的压力或流速，使用你的泵可以提供的最大流速。这也会提供很好的装柱效果。

6. 柱床高度恒定后，保持装柱流速，至少三倍柱床体积。在柱子上标记柱床高度。
7. 停止泵的运行，关闭柱子出口。
8. 如果使用装柱容器，拆下装柱容器，将适配器连接柱子。
9. 取下适配器进口，将适配器向下推进到柱子，直到标记位置。允许装柱溶液淹没适配器进口。将适配器锁在合适的位置。
10. 将柱子连接到泵或者色谱系统，开始平衡，如果需要重新调整适配器。

样品制备

-  调整样品的组成与结合缓冲液（参见下面）相同。例如，使用结合缓冲液稀释样品，或者使用除盐柱进行缓冲液交换（参见第11章）。
-  在柱子上样前，立即使用0.22微米或者0.45微米的滤器和/或离心机处理品。如果样品太粘稠，为了防止堵塞柱子，使用结合缓冲液进行稀释，增加裂解处理（超声、匀浆），或者加入DNase/RNase减少核酸片断的大小。

缓冲液制备

结合缓冲液:	100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8 或PBS(20 mM 磷酸钠, 280 mM NaCl, 6 mM 氯化钾), pH 7.4
洗脱缓冲液:	结合缓冲液中含有2.5 mM脱硫生物素
再生缓冲液:	0.5 M NaOH 或者结合缓冲液中含有1 mM HABA (2-[4'-hydroxy-benzeneazo] 苯甲酸)

参见附录4获得柱料再生的详细信息。

-  缓冲液制备使用的水和化学试剂应该是高纯度的。使用前使用0.22微米或者0.45微米的滤器过滤缓冲液。

纯化

1. 推荐的线性流速是150厘米/小时。
2. 拿掉塞子，将柱子和系统进行连接。避免在柱子中引入气泡。
3. 如果柱子在20%乙醇中储存，使用至少5倍柱子体积（CV）的蒸馏水，或者使用线性流速是50到100厘米/小时的结合缓冲液，洗去乙醇。
4. 使用至少5倍柱子体积的结合缓冲液平衡柱子。
5. 将已经进行预处理的样品上样。
6. 使用5到10倍柱子体积的结合缓冲液进行清洗，或者直到在流出物中没有材料出现。
7. 使用6倍柱子体积的洗脱缓冲液进行洗脱。可以使用预装的除盐柱（参见第11章）进行洗脱组分的缓冲液交换。
8. 洗脱之后，按照附录4描述的流程，进行柱子的再生。

 规模放大时，一般保持柱床高度和线性流速（厘米/小时）不变，而增加柱床的直径和体积流速（毫升/分钟）。参见图7.4获得使用此柱料规模放大的例子。

 将StrepTactin Sepharose High Performance保存在20%乙醇内，置于4摄氏度到8摄氏度。储存后，使用前应用结合缓冲液进行平衡。

使用StrepTrap HP1毫升和5毫升的柱子进行纯化

StrepTrap HP 1毫升和5毫升的柱子是用生物兼容的聚丙烯制造，与生物分子没有相互作用。预装的StrepTrap HP柱子凭借方便的设计可以提供快速、简单和容易的分离。这些柱子可以与注射器、实验室泵、或者象AKTAdesign这样的色谱系统连用进行分离。

StrepTrap HP柱子供应时，在进口处有塞子，在出口处有snap-off末端。多孔的顶部和底部玻璃陶制材料耐受高流速。StrepTrap HP柱子属于预装柱HiTrap家族。注意HiTrap柱子不能被打开或者重装。

表A 4.3（参见附录4）总结了预装StrepTrap HP柱子的特性。



图7.2 StrepTrap HP1毫升和5毫升的柱子，可以快速方便的纯化带有Strep-tag II标签的重组蛋白，以浓缩形式和小体积产生高纯度物质。

样品制备

- 调整样品的组成与结合缓冲液（参见下面）相同。例如，使用结合缓冲液稀释样品，或者使用除盐柱进行缓冲液交换（参见第11章）。
- 在柱子上样前，立即使用0.22微米或者0.45微米的滤器和/或离心机处理品。如果样品太粘稠，为了防止堵塞柱子，使用结合缓冲液进行稀释，增加裂解处理（超声、匀浆），或者加入DNase/RNase减少核酸片断的大小。

缓冲液制备

结合缓冲液：100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8
或PBS(20 mM 磷酸钠, 280 mM NaCl, 6 mM 氯化钾), pH 7.4
洗脱缓冲液：结合缓冲液中含有2.5 mM脱疏生物素
再生缓冲液：0.5 M NaOH
或者结合缓冲液中含有1 mM HABA (2-[4'-hydroxy-benzeneazo] 苯甲酸)

参见附录4获得StrepTrap1毫升和5毫升再生的详细信息。

- 缓冲液制备使用的水和化学试剂应该是高纯度的。使用前使用0.22微米或者0.45微米的滤器过滤缓冲液。

纯化

- 使用结合缓冲液将注射器或者泵的管道充满。移走塞子，“一滴滴”将柱子与注射器或者泵的管道相连（使用提供的连接头），这样可以避免在柱子中引入气泡。
- 移走柱子出口处的snap-off末端。使用至少5倍柱体积（CV）的蒸馏水或者结合缓冲液清洗掉乙醇。
- 使用至少5倍柱体积的结合缓冲液平衡柱子，对于1毫升或者5毫升的柱子，分别使用1毫升/分钟或者5毫升/分钟的流速。
- 将注射器安装在Luer接头，或将泵连接在柱子上，进行样品的上样。
- 使用5到10倍柱体积的结合缓冲液进行清洗，直到在洗脱液中没有材料出现。
- 使用6倍柱体积的洗脱缓冲液进行洗脱。洗脱的组分可以使用预装的除盐柱进行缓冲液交换（参见第11章）。
- 洗脱之后，按照附录4描述的流程，进行柱子的再生。

- 通过增加样品上样量和增加流速五倍，从1毫升到5毫升StrepTrap HP柱子的规模扩大很容易进行。另外一种快速规模扩大的方法是，依次串联连接两个或者三个StrepTrap HP柱子（后压力会增加）。参见图7.4获得使用这种柱料进行规模扩大的例子。

- StrepTrap HP柱子可以快速处理样品，使用0.5 M氢氧化钠很容易进行清洁。

- 将StrepTrap HP柱子保存在20%乙醇内，置于4摄氏度到8摄氏度。储存后，使用前应用结合缓冲液进行平衡。

应用实例

1. 双标签蛋白的两步亲和纯化增加了纯度

为了进行功能研究的方法研发，E. coli表达的双标签Strep-tag II-(组氨酸)₆蛋白（相对分子量约15 400）进行了纯化。两步纯化流程由包含HisTrap HP（预装有Ni Sepharose High Performance）上的固定金属亲和色谱（IMAC），接着StrepTrap HP上的亲和色谱组成。由于高纯度是成功的功能研究的关键，两步纯化方法的结果与单独的IMAC和亲和色谱步骤进行了比较。所有的运行于4摄氏度在ÄKTApexpress上进行。使用的条件如下：

单独的HisTrap HP纯化

柱子: HisTrap HP 1 ml
样品: 含有Strep-tag II-(组氨酸)₆蛋白 (Mr ~15 400)的 E. coli 裂解液
样品体积: 15 ml
结合缓冲液: 20 mM 磷酸钠, 500 mM NaCl, 20 mM 咪唑, pH 7.5
洗脱缓冲液: 20 mM 磷酸钠, 500 mM NaCl, 500 mM 咪唑, pH 7.5
流速: 0.8 ml/min
系统: ÄKTApexpress

单独的StrepTrap HP 纯化

柱子: StrepTrap HP 1 ml
样品: 含有Strep-tag II-(组氨酸)₆蛋白 (Mr ~15 400)的E. coli裂解液
样品体积: 15 ml
结合缓冲液: 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0
洗脱缓冲液: 结合缓冲液中含有2.5 mM 脱巯生物素
流速: 0.8 ml/min
系统: ÄKTApexpress

两步HisTrap HP和StrepTrap HP纯化

柱子: HisTrap HP 1 ml
样品: 含有Strep-tag II-(组氨酸)₆蛋白(Mr ~15 400)的E. coli裂解液
样品体积: 15 ml
结合缓冲液: 20 mM 磷酸钠, 500 mM NaCl, 20 mM 咪唑, pH 7.5
洗脱缓冲液: 20 mM 磷酸钠, 500 mM NaCl, 500 mM 咪唑, pH 7.5
流速: 0.8 ml/min
柱子: StrepTrap HP 1 ml
样品: 从HisTrap HP上洗脱的组分, 1 ml
结合缓冲液: 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0
洗脱缓冲液: 结合缓冲液中含有2.5 mM脱巯生物素
流速: 0.2 ml/min
系统: ÄKTApexpress

SDS-PAGE分析（图7.3）显示单独的HisTrap HP纯化产生靶蛋白和许多不同的不纯物（泳道3）。仅使用StrepTrap HP也产生了靶蛋白，这次仅有一个不纯物（泳道6）。作为对比，HisTrap HP连着StrepTrap HP的组合产生的靶蛋白纯度超过95%（泳道5）。

这个例子清楚地显示，双标签方法进行蛋白纯化的好处，尤其当需要高纯度时。HisTrap HP和StrepTrap HP在ÄKTApexpress上依次运行，满足了能够产生这样结果的快速和高效色谱系统的需要。

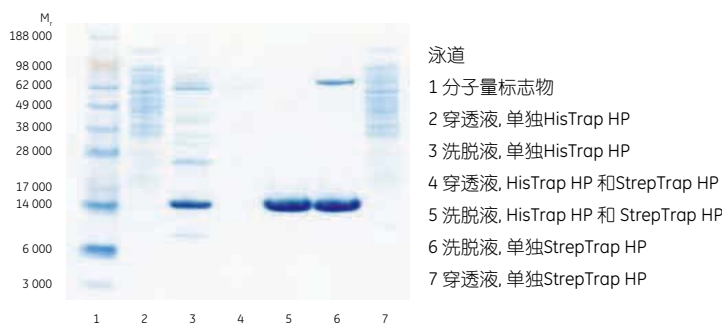


图7.3 HisTrap HP 1 ml和StrepTrap HP 1 ml的单独纯化，与两个柱子结合的两步亲和纯化的SDS-PAGE分析（还原状态）。数据由瑞典斯德哥尔摩Biovitrum的Martina Nilsson, Robert Svensson, 和Erik Holmgren提供。

2. 从1毫升到5毫升，再到29毫升柱子的规模放大

可以通过增加柱床体积并且保持阻滞时间恒定，进行规模扩大。在规模放大过程中，这种方法保证了色谱的性能。

使用的蛋白是双标签的荧光蛋白，E. coli裂解液中含有的六组氨酸-mCherry- Strep-tag II 蛋白（相对分子量31 000），可以在587纳米和280纳米检测到。首先进行了StrepTrap HP1毫升柱子的纯化，然后扩大规模到5毫升柱子，接着进一步扩大到29毫升的XK 26/20柱子，预装有StrepTactin Sepharose High Performance（柱床高度5.5厘米）。所有柱子的阻滞时间大约为两分钟。图7.4显示了色谱图和运行条件。

从1毫升StrepTrap HP柱子到5毫升柱子的规模放大，蛋白上样量增加了五倍；从1毫升StrepTrap HP柱子到29毫升的XK 26/20柱子的规模放大，蛋白上样量增加了二十五倍。依据吸收测定计算得到的产率，分别为2.2、9.4和52.7毫克（表7.2）。SDS-PAGE（数据未显示）显示从柱子上洗脱的组分纯度是相似的。

这些柱子得出了具有可比性的结果，验证了从StrepTrap HP柱子到大一些装有StrepTactin Sepharose High Performance的XK 26/20柱子，规模放大纯化的简便性和重复性。

表7.2 StrepTrap HP和XK 26/20柱子产量的总结

柱子	产量
StrepTrap HP, 1 ml	2.2
StrepTrap HP, 5 ml	9.4
XK 26/20 装有StrepTactin Sepharose High Performance, 29 ml	52.7

柱子: StrepTrap HP 1毫升, StrepTrap HP 5毫升, 装有StrepTactin Sepharose High Performance的XK 26/20柱子29毫升、柱床高度5.5厘米

样品: 含有六组氨酸-mCherry- Strep-tag II 蛋白（相对分子量31 000）的E. coli裂解液

样品体积: 4.2毫升（StrepTrap HP 1毫升）, 21毫升（StrepTrap HP 5毫升）, 105毫升（XK 26/20柱子）

结合缓冲液: 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0

洗脱缓冲液: 结合缓冲液中含有2.5 mM脱疏生物素

流速: StrepTrap HP 1毫升: 1.0 ml/min （样品上样和使用0.5 M NaOH再生时0.5 ml/min）
StrepTrap HP 5毫升: 5.0 ml/min （样品上样和使用0.5 M NaOH再生时2.5 ml/min）

XK 26/20柱子: 13 ml/min （使用0.5 M NaOH再生时6.5 ml/min）

再生: 三倍柱体积（CV）的蒸馏水, 三倍柱体积的0.5 M NaOH、三倍柱体积的蒸馏水

系统: ÄKTAexplorer

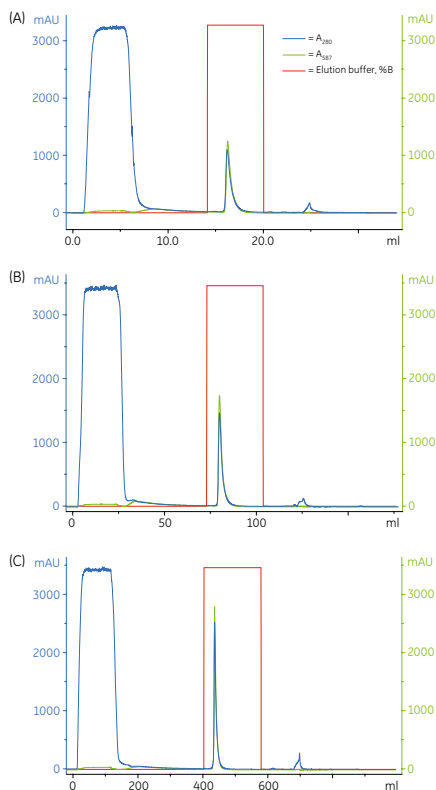


图7.4 六组氨酸-mCherry- Strep-tag II 蛋白纯化的规模放大。（A）StrepTrap HP 1毫升，（B）StrepTrap HP 5毫升，（C）装有StrepTactin Sepharose High Performance的XK 26/20柱子29毫升、柱床高度5.5厘米。

3. 六组氨酸-mCherry- Strep-tag II的亲 and 色谱可重复性自动化两步纯化

双标签的红色荧光蛋白，六组氨酸-mCherry- Strep-tag II 蛋白（相对分子量31 000），使用自动化两步亲和色谱纯化方法进行了纯化，分别为StrepTrap HP 1毫升(为了结合Strep-tag II)和HisTrap HP 1毫升(为了结合六组氨酸标签)。纯化使用ÄKTAexpress的AC-AC操作规程的自动化模式。

为了研究重复性，进行了三种分别的两步纯化。样品首先上样到三个独立的1毫升StrepTrap HP 柱子，来结合靶蛋白和洗去E. coli蛋白，因而降低了蛋白降解的危险。接下来，标记的蛋白从三个独立的StrepTrap HP柱子上洗脱，上样到同一种HisTrap HP 1毫升（第二步亲和纯化）。

图7.5显示每一个AC-AC纯化的色谱图和运行条件。图7.6显示从1毫升StrepTrap HP柱子收集的三种纯化组分的SDS-PAGE分析。

柱子（AC1）：	StrepTrap HP 1毫升（三个独立的柱子）
样品：	含有六组氨酸-mCherry- Strep-标签 II（相对分子量31 000）的E. coli裂解液
样品体积：	每根柱子15毫升
结合缓冲液：	100 mM Tris-HCl, 150 mM氯化钠, 1 mM EDTA, pH 8.0
洗脱缓冲液：	结合缓冲液中含有2.5 mM脱巯生物素
流速：	1.0毫升/分钟
系统：	ÄKTAexpress
柱子（AC2）：	HisTrap HP1毫升
样品：	从1毫升StrepTrap HP柱子上三个不同的运行洗脱的组分
结合缓冲液：	20 mM磷酸钠、500 mM氯化钠、5 mM咪唑、pH 7.4
洗脱缓冲液：	结合缓冲液中含有500 mM咪唑
流速：	1.0毫升/分钟
系统：	ÄKTAexpress

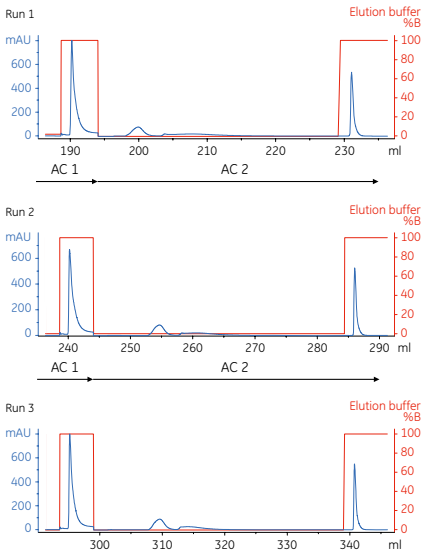


图7.5双标签荧光蛋白六组氨酸-mCherry- Strep-tag II 蛋白的自动纯化，在StrepTrap HP1毫升（AC1，显示洗脱峰）和HisTrap HP 1毫升（AC2，显示整个运行过程）上使用两步亲和和层析。

三个纯化结果在产量和双标签蛋白的纯度方面非常相似，这就证明了自动化两步亲和纯化流程的高度重复性。除了在相对分子量31000的靶蛋白，图7.6显示在相对分子量近似10000和21000分别有两个污染物。这可能是因为在SDS-PAGE分析过程中，靶蛋白发生了片断化。在严格的处理条件下，如SDS 变性和煮沸(参见下面的参考文献1和2)，荧光发光基团MYG (氨基酸85-87)的acylimine连接可能水解。图7.7显示六组氨酸-mCherry-Strep-tag II在F(84)和MYG 发光基团之间的剪切，产生了一个相对分子量为9558的N-末端片断和一个相对分子量为20741的C-末端片断。靶蛋白的全长和相对分子量21000的片断经过质谱分析进行了证实。



图7.6 六组氨酸-mCherry-Strep-tag II的三种不同的自动化两步亲和纯化的SDS-PAGE分析（还原状态）。

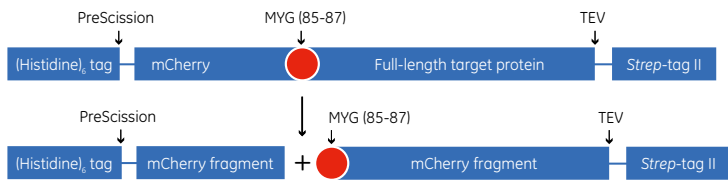


图7.7 六组氨酸-mCherry-Strep-tag II在F(84)和MYG发光基团之间的剪切，产生了一个相对分子量为9558的N-末端片断和一个相对分子量为20741的C-末端片断。

参考文献

1. Quillin et al., Biochemistry, 44, 5774–578 (2005).
2. Shkrob et al., Biochem. J., 392, 649–654 (2005).

问题解决

问题	可能原因	解决方法
增加后压力	溶液高粘度。	使用较低流速。 在机械性裂解之前，增加细胞浆的稀释程度，或者裂解之后进行稀释降低黏度。 如果由于宿主的核酸浓度高造成的裂解液非常粘，连续超声直到粘度降低，和/或加入另外的DNase。此外，可以用注射器针头吹打裂解液几次。 如果纯化在4摄氏度进行，如果可能，尝试在室温重复纯化过程（室温条件下样品的粘度降低）。 样品上样过程中降低流速。
	细胞破碎不充分。	增加机械性细胞破碎的效率，如增加超声时间。（超声时将样品放置在冰上，避免起泡和过热，因为这样会使靶蛋白变性。过度超声会引起宿主蛋白和靶蛋白的共纯化）。
	未澄清的裂解液反复冻融会增加沉淀和聚合体。	在柱子上样之前，离心或使用0.22或0.45微米的滤器进行过滤。
柱子堵塞	顶部的滤器堵塞。	更换顶部的滤器（如果不使用StrepTrap HP柱子上样）。如果使用StrepTrap HP柱子，更换柱子。而且，在进行下一个样品上样之前，优化样品的预处理方法。
	样品中细胞残骸可能堵塞了柱子。	按照附录4清洁柱子。在柱子上下一个样品之前，离心和/或使用0.22或0.45微米的滤器过滤样品，或别的优化的样品预处理方式。
与柱子没有结合 或结合弱	穿透液中出现了蛋白。	缓冲液/样品成分不理想；检查样品和结合缓冲液的pH值和组成成分。pH一般应高于7或更高。
	没有Strep-tag II。	使用蛋白酶缺陷的E. coli表达株。在细胞裂解过程中加入蛋白酶抑制剂。
	Strep-tag II没有用。	将Strep-tag II和另一个蛋白末端进行融合。使用另一个连接。

问题	可能原因	解决方法
	抽提液中的生物素化的蛋白封闭了配基。 由于高蛋白浓度，蛋白在柱子上沉淀。	如果含有生物素的抽提液将要被纯化，加入卵白素（生物素的封闭液）。总E.coli细胞裂解液的可溶部分生物素含量，大约为每升培养物1纳摩（A550=1.0）。每纳摩生物素加入2到3纳摩卵白素单体。 按照附录4的指导清洁柱子。在下面的运行中，降低样品的数量，或者通过线性梯度洗脱，而不是step-wise洗脱，降低蛋白的浓度。尝试去污剂或改变氯化钠的浓度。
污染的蛋白	污染是靶蛋白的截短形式。 污染物是通过二硫键共价连接到重组蛋白的。 污染物是通过非共价键连接到重组蛋白的。	使用蛋白酶缺陷的E. coli表达株。在细胞裂解后加入蛋白酶抑制剂。将Strep-tag II和其它蛋白末端进行融合。检查内部翻译起始位点（对于C末端Strep-tag II）或提前的终止位点（对于N末端Strep-tag II）。在样品和缓冲液中使用EDTA。 在细胞裂解和纯化的所有缓冲液中加入还原剂。 在所有的细胞裂解和纯化缓冲液增加离子强度（高达1摩氯化钠）或者加入温和的去污剂（0.1% Triton X-100, 0.1% Tween, 0.1% CHAPS）。调整pH减少潜在的静电相互作用。
不希望的气泡形成	未澄清的裂解液可能增加纯化过程中的气泡形成。 当柱子保存在4摄氏度到8摄氏度，而在室温立即使用时，由于降低了气体的溶解性，可能产生气泡。	在色谱系统中连接流速限制器可以阻止的气泡形成。如果连接了流速限制器，重要的是改变压力限制，来调整流速限制器产生的额外压力。不要超出ÄKTAdesign系统上柱子的压力限制。 当使用StrepTrap HP柱子和ÄKTAdesign系统，重要的是在ÄKTAdesign系统上改变压力限制到0.5兆帕（5 巴）柱子和流速限制器产生的压力分别为0.3兆帕和0.2 兆帕）。 在柱子使用前，先在室温放置数分钟，让柱子温度平衡到室温。

第八章 其它重组或天然蛋白的简单纯化

如前几章介绍，使用亲和层析提纯特定的组氨酸或GST标签蛋白有众多产品可供选用，而带有其它标签或不带标签的蛋白也同样能够通过亲和层析单步纯化到令人满意的纯度。实际上，单步纯化既节省了时间（人力和仪器的时间），也能够降低目的蛋白变性的风险，同时也尽可能避免能够与目的蛋白有微弱结合的一些重要成分的丢失。对于高通量的纯化平台，额外需求的纯化步骤将使纯化过程更为复杂，而并行的纯化方式则成为可能。

亲和层析能够纯化特征相似的一种或多种蛋白，该技术通过目的蛋白与偶联在层析介质上的特定配体之间可逆的结合作用分离蛋白。只要使用目的蛋白合适的配体，单步亲和纯化就能够获得对目的蛋白高特异性、高分辨、高载量的纯化。亲和层析的基本原理见附录9。



图73：使用特定的亲和层析单步纯化。

可直接使用的亲和纯化柱

表22列出了可以直接用于亲和纯化的HiTrap和HiPrep柱子，所有柱子都提供有详细的使用步骤，包括获取最优纯化结果所需的溶液和步骤。如果大规模纯化需要较高的结合容量，可以在单步纯化过程中将HiTrap柱子串联在一起使用，同样也提供有组装较大柱子的介质。

产品	应用	大约结合能力 (mg/ml柱材)	平均颗粒 大小	pH稳定性 (长期)
MabSelect™	IgG, IgG亚型, 单克隆	30mg 人IgG	85 μ m	3-10
MabSelect SuRe™	IgG, IgG亚型, 单克隆	30mg 人IgG	85 μ m	3-13
MabSelect Xtra™	IgG, IgG亚型, 单克隆	40mg 人IgG	75 μ m	3-10
rProteinA FF	IgG, IgG亚型, 人IgG	50mg 人IgG	90 μ m	3-10
Protein A HP	IgG, IgG亚型, 人IgG	20mg 人IgG	34 μ m	3-9
Protein G HP	IgG, 大鼠IgG, 小鼠IgG	25mg 人IgG	34 μ m	3-9
IgM Purification HP	杂交瘤上清中的单克隆IgM	5mg 人IgM	34 μ m	3-11
IgY Purification HP	卵黄中的IgY	20mg纯IgY	34 μ m	3-11
Heparin HP	抗凝血因子III和其它凝血因子, 脂蛋白, 脂酶, DNA结合蛋白, 蛋白质合成因子	3mg 牛源AT III	34 μ m	5-10
Blue HP	白蛋白, 需要核苷的酶, 凝血因子	20mg人白蛋白	34 μ m	4-12
HisTrap HP	优化用于高效纯化组氨酸标签蛋白	至少40mg组氨酸标签蛋白	34 μ m	3-12 ¹

产品	应用	大约结合能力 (mg/ml柱材)	平均颗粒 大小	pH稳定性 (长期)
HisTrap FF	优化用于纯化组氨酸标签蛋白	40mg组氨酸标签蛋白	90 μ m	3-12 ¹
HisTrap FF 16/10	大规模优化纯化组氨酸标签蛋白	40mg组氨酸标签蛋白	90 μ m	3-12 ¹
HisTrap FF crude	优化用于纯化组氨酸标签蛋白，优化用于直接从粗制细胞裂解物中纯化	40mg组氨酸标签蛋白	90 μ m	3-12 ¹
IMAC HP	纯化带有暴露在外组氨酸基团的蛋白和多肽。未装载金属离子的介质	当装载了Ni ²⁺ 时为40mg组氨酸标签蛋白。依赖于金属离子和蛋白。	34 μ m	3-12 ²
IMAC FF	纯化带有暴露在外组氨酸基团的蛋白和多肽。未装载金属离子的介质	当装载了Ni ²⁺ 时为40mg组氨酸标签蛋白。依赖于金属离子和蛋白。	90 μ m	3-12 ²
HiPrep IMAC FF 16/10	大规模优化纯化带有暴露在外组氨酸基团的蛋白和多肽。未装载金属离子的介质	当装载了Ni ²⁺ 时为40mg组氨酸标签蛋白。依赖于金属离子和蛋白。	90 μ m	3-12 ²
Chelating HP	纯化带有暴露在外组氨酸基团的蛋白和多肽。未装载金属离子的介质	23 μ mol Cu ²⁺	34 μ m	3-13
NHS-activated HP	通过伯氨基偶联自身特异性的配体 ³		34 μ m	3-12
Streptavidin HP	生物素化的分子。生物素标签蛋白。	>300nmol 生物素	34 μ m	4-9
GSTrap 4B	GST标签蛋白，其它GST或谷胱甘肽依赖的蛋白。	>5mg 马肝脏GST	90 μ m	4-13
GSTrap HP	GST标签蛋白，其它GST或谷胱甘肽依赖的蛋白。高效纯化。	10mg重组GST蛋白 10mg GST，	34 μ m	3-12
GSTrap FF	GST标签蛋白，其它GST或谷胱甘肽依赖的蛋白。	11mg GST 标签蛋白，分子量 43000	90 μ m	3-12
GSTrap FF 16/10	大规模纯化GST标签蛋白，其它GST或谷胱甘肽依赖的蛋白。	10mg GST， 11mg GST 标签蛋白，分子量 43000	90 μ m	3-12
Benzamidine FF (High Sub)	除去或纯化丝氨酸蛋白酶	≥35mg胰蛋白酶	90 μ m	2-8

¹ Ni²⁺ 剥离的介质

² 未装载金属离子的介质

³ 介质已经预活化，必须偶联合适的配体到介质上以获得亲和介质。

制备特定的纯化柱

如果没有合适的亲和介质可以使用，则需要自制特定的亲和纯化柱，比如一种特定的重组蛋白需要根据通常的原则被高效制备时。

首先应准备所需的配体，需要制备抗体、检测其与目的蛋白的亲和能力、在交联至层析介质之前将其纯化等步骤。有关蛋白纯化基本策略的详细说明见第7章或GE Healthcare的《蛋白纯化手册》，亲和层析基本原理的详细说明见GE Healthcare的《亲和层析，原理与方法手册》。

使用HiTrap NHS活化的HP简单制备亲和纯化柱

NHS活化的Sephacrose High Performance是专为共价交联含有伯胺基的配体设计的层析介质，这是将蛋白偶联至层析介质上最常用的一种方法。这种介质基于高度交联的琼脂糖珠，其上有由10个原子构成的臂通过环氧氯丙烷连在介质上。这种介质可以被N-羟基丁二酰亚胺活化。取代水平约为每ml介质10 μ mol NHS基团，由于介质本身高度亲水的特性，非特异吸附在上面的蛋白（这些蛋白能够降低目的蛋白的结合容量）可以忽略。

下面介绍了使用预装的HiTrap NHS活化的HP柱制备亲和介质的步骤，该方法适用于所有NHS活化的Sephacrose产品。



纯化每种目的蛋白的不同配体所用的最佳结合和洗脱条件必须分别确定。



为在交联之前保持其稳定，激活的介质都贮存在100%的异丙醇中，只能在与配体交联时才能去除异丙醇。

准备缓冲液

酸化溶液：1mM HCl（冰浴）

交联缓冲液：0.2M NaHCO₃，0.5M 氯化钠，pH 8.3



使用高质量的水和化学药品，推荐用0.45 μ m滤膜过滤。



交联的pH值范围在pH6.5-9，pH约为8时产量最高。

准备配体和柱子

1. 将所需配体溶解在交联缓冲液中至浓度为0.5-10mg/ml（对于蛋白成分的配体），根据需要可以使用脱盐柱更换缓冲液体系。最佳浓度取决于配体，最佳样品体积与一倍柱体积相同。

2. 移除上盖，加一滴1mM冰浴的HCl至柱子顶端防止气泡。
3. 将柱子顶端与注射器或系统连接。
4. 移除底帽。

交联配体

1. 用6倍体积冰浴的1mM HCl洗去异丙醇。



流速不能过高（HiTrap1ml柱所用的最大流速为1ml/min，相当于注射器每分钟30滴；HiTrap5ml柱的最大流速为5ml/min，相当于注射器每分钟120滴），否则介质可能被不可逆压缩。

2. 迅速将1倍柱体积的配体溶液加至柱子上。
3. 密封柱子，使之在25° C静置15-30min（或4° C 4h）



如果需要较大体积的配体溶液，则重新循环使用该溶液。例如，若使用注射器，可将第二根注射器连接在柱子的出口处，将溶液缓慢泵回，往复15-30min；若使用蠕动泵，可再循环样品通过柱子。

若需要可在此时测量交联效率，这些过程在每个HiTrap NHS激活的HP柱提供的指南中都有介绍。

洗涤和去活化

该步骤能够将未能交联到配体上的多余活性基团去活化，并且洗去非特异结合的配体。

溶液A：0.5M乙醇胺，0.5M 氯化钠，pH 8.3

溶液B：0.1M 乙酸，0.5M 氯化钠，pH 4

1. 加入3×2 倍柱体积的溶液A。
2. 加入3×2 倍柱体积的溶液B。
3. 加入3×2 倍柱体积的溶液A。
4. 密封柱子，静置15-30min。
5. 加入3×2 倍柱体积的溶液B。
6. 加入3×2 倍柱体积的溶液A。
7. 加入3×2 倍柱体积的溶液B。
8. 加入2-5倍柱体积的中性pH缓冲液。

柱子现在可供使用。



将柱子保存在其特定的贮存缓冲液中。



反应混合物中存在的伯胺基团能够抑制交联反应，因此禁止使用Tris类缓冲液或添加剂。

纯化

 纯化目的蛋白的不同配体所用的最佳结合和洗脱条件必须分别确定，文献和教科书可能提供了一些有价值的参考，下面列出了可以首先尝试的基本步骤。

 使用高质量的水和化学药品，推荐用0.45 μm的滤膜过滤。

 样品在使用前应离心和（或）用0.45 μm的滤膜过滤。若样品特别粘稠可用结合缓冲液稀释、增加裂解处理（超声或匀浆）或用DNase或RNase处理。适当调节样品适应结合缓冲液的组成可以提高样品的结合能力，可用结合缓冲液稀释或用脱盐柱更换缓冲液（见第9章）。

准备柱子

 空白运行（使用结合缓冲液代替样品）一次以除去松散结合的配体（见下面所示）。

1. 用3倍柱体积的结合缓冲液洗涤。
2. 用3倍柱体积的洗脱缓冲液洗涤。
3. 用5-10倍柱体积的结合缓冲液平衡柱子。

纯化

1. 加入样品，其最佳流速取决于配体的结合常数，对于HiTrap 1ml的柱子通常推荐的流速范围在0.2-1ml/min。
2. 用5-10倍柱体积的结合缓冲液洗涤，或直到流出物中没有蛋白为止。

 如果目的蛋白与配体之间的作用力比较弱，应避免过度洗涤，否则会降低产量。

3. 用2-5倍柱体积的洗脱缓冲液洗脱。
4. 如果需要的话可以用预装的脱盐柱将纯化的组分脱盐并更换到所需缓冲液中。

再平衡柱子

用10倍柱体积结合缓冲液洗涤柱子即可完成再平衡。

第九章 多步纯化标签和不带标签的重组蛋白

重组蛋白表达时可能会产生大量带有亲和标签的蛋白，使得用亲和层析单步纯化就足以使其纯度达到要求。但是单步纯化通常是不够的，亲和标签有时会影响蛋白纯化后的使用，在这种情况下就需要多步纯化。

处理重组蛋白的突出优点在于可以比较方便地获取有关该蛋白自身（如氨基酸序列，分子量，等电点，功能特点等）和杂质（表达宿主可能已被详尽地研究过）的信息。根据这些信息可以使用相应的检测方法并使用适当的样品制备和纯化步骤，一种称为“捕获、中间纯化和精细纯化”（CIPP）的纯化策略。该策略既适用于制药工厂也可用于实验室研究中，使方法开发更快、纯化产品耗时更短并能带来较好的经济效益。

本部分简单介绍了各种多步蛋白纯化中推荐的方法，附录9给出了在此讨论的不同技术的有用背景知识。推荐参考《蛋白纯化手册》（出自GE Healthcare）来设计高效实用的蛋白纯化策略。

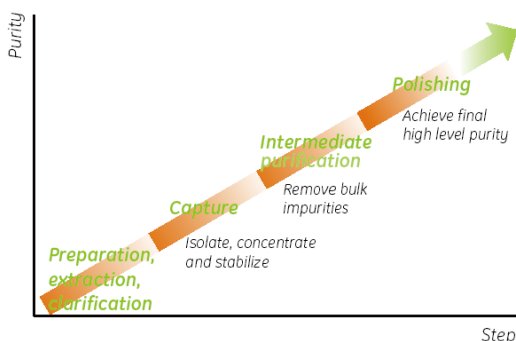


Fig 74. Preparation and CIPP.

图74：制备和

CIPP的应用如下：

设想纯化过程包括三个阶段--捕获、中间纯化和精细纯化。每个阶段都可能包括一个或多个纯化步骤。

为纯化过程的每个步骤设定一个特定的目标。

特定纯化步骤中出现的问题取决于起始材料的特征，因此每一个纯化步骤的目标可能因其在整个过程中的位置而不同，也就是在开始时是从未经加工的样品中分离出产品，中间过程中是对已被部分纯化的样品进一步纯化，最后阶段是对已经很纯的样品做最后的纯化。

捕获阶段的目标是分离、浓缩并稳定目的蛋白，该产品应被浓缩并转移至能够保持其活性的环境中。

中间纯化阶段的目标是去除大量的杂质，如其它蛋白和核酸、内毒素、病毒等。

在精细纯化阶段除了一些含量很少的成分或密切相关的物质外大部分杂质已经被去除，这一阶段的目标是通过去除任何残留的杂质或密切相关的物质使样品最终达到纯净。

 最优选择并组合“捕获、中间纯化和精细纯化”的技术对于高效的纯化过程非常重要。

选择并组合纯化技术

不同蛋白可根据其特定的性质通过不同的方法被分离纯化，如表23所示。

表23： 蛋白纯化技术。

蛋白性质	层析技术
电荷	离子交换层析（IEX）
	层析聚焦
大小	凝胶过滤层析（GF）
疏水性	疏水作用层析（HIC）
	反相层析（RPC）
生物识别（配体特异性）	亲和层析（AC）

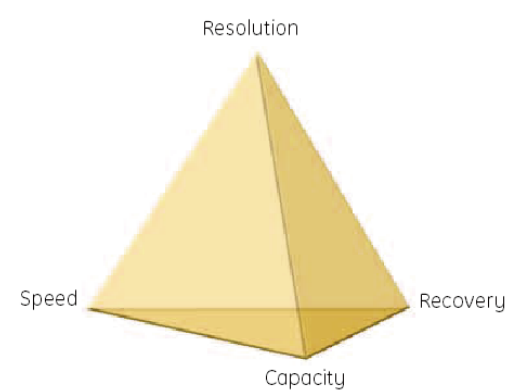


图75： 每种层析技术都是分辨率、容量、速度和回收率的平衡。

分辨率通过选择合适的技术和层析介质最终产生窄的分离峰来实现。通常在最后纯化阶段分辨率最难实现，因为这时杂质和目的蛋白的性质非常接近。

上述简单模型中所示的**容量**是指纯化过程中能够加入的目的蛋白的量，有些情况下样品的加入量并不受目的蛋白量的限制而是受体积（如凝胶过滤层析）或同样结合柱子的大量杂质所限。

速度在纯化开始阶段最重要，因为此时蛋白尚未被稳定。

回收率随着纯化过程的进行由于纯化产物价值的逐渐升高而变得越发重要。

- 选择合适的层析技术以适应纯化目标的要求。
- 根据每个步骤起始或结束时样品的情况和每种技术的主要优势合理组合各种技术。
- 组合互相垂直的技术，它们分别使用不同的分离机制。
- 记住“必需纯度”和“必需产量”之间的相互作用，通常情况下每增加一步纯化步骤都将增加纯度同时降低产量（脱盐步除外）。

CIPP各个阶段的每种纯化技术所适用的范围指导见表24。

表24： CIPP纯化技术的适用范围。

技术	主要特性	捕获	中间纯化	精细纯化	样品起始条件	样品最终条件
IEX	高分辨 高载量 高速	+++	+++	+++	低离子强度，样品体积没有限制	高离子强度或改变pH，高浓度样品
HIC	高分辨 高载量 高速	++	+++	+	高离子强度，样品体积没有限制，需要加入盐	低离子强度，高浓度样品
AC	高分辨 高载量 高速	+++	+++	++	特异的结合条件，样品体积没有限制	特殊的洗脱条件，高浓度样品
GF	使用Superdex 可获得高分辨		+	+++	有限的样品体积（<5%总柱体积），有限的流速	如果需要可以更换缓冲液，稀释样品
RPC	高分辨		+	+++	样品体积通常没有限制。可能需要加入添加剂。	在有机溶剂中进行，可能会丧失生物学活性。

- 通过组合方法，尽量减少纯化步骤之间对样品进行的操作，以避免在下一步骤前改变样品的条件。产物应该从第一根柱子中用合适于第二步起始纯化的缓冲液洗脱（见表24）。
- 疏水作用层析（需要高盐来增强和介质的结合）非常适合于在硫酸铵沉淀并净化后作为捕获步骤。样品的盐浓度和总体积在从疏水作用层析柱上洗脱下来时会显著降低。将分离的样品稀释或用脱盐柱进行快速的缓冲液更换可以用于准备进行下一步的离子交换层析或亲和层析。
- 凝胶过滤层析是一种非结合技术，样品容量有限，不受缓冲液条件的影响。因为它工作的原理，在凝胶过滤层析中，样品区在通过柱子时会变宽。洗脱的物质有时需要浓缩。凝胶过滤层析适合于在任何浓缩技术后使用（离子交换层析、疏水作用层析、亲和层析）。

最终策略的选择通常依赖于特异的样品性质和纯化需要达到的水平。逻辑上的技术组合在图76中显示。

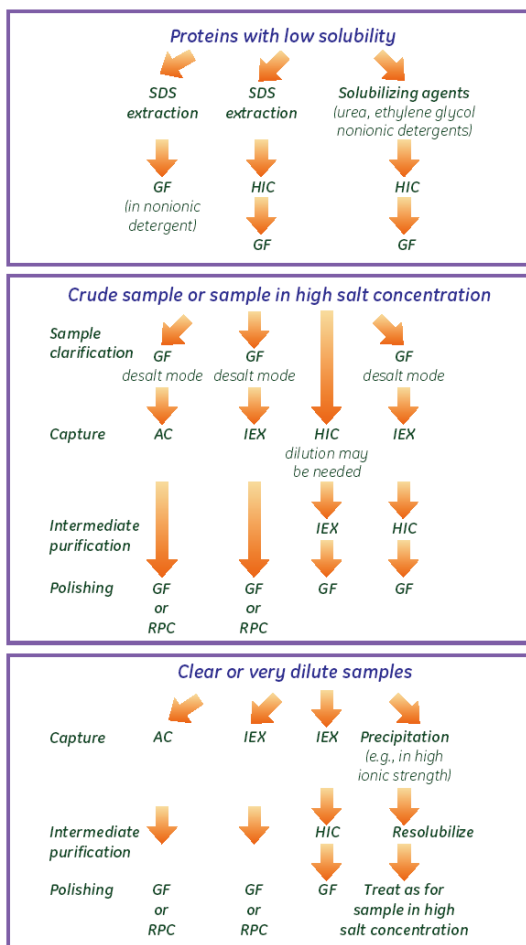


图76: 逻辑上层析技术组合的例子。



对于捕获步骤而言，选择一种能结合目的蛋白而尽量不结合杂质的技术。某些况下，选择一种技术不结合目的蛋白但结合必须除去的杂质（比如蛋白酶或主要的杂质）的技术也有优点。

样品用不同的技术和不同的分离性能组合来纯化。比如，在一个离子交换层析-疏水作用层析-凝胶过滤层析的组合策略中，捕获阶段根据电荷的不同（离子交换层析），中间纯化步骤根据疏水性的不同（疏水作用层析），最终精细纯化阶段根据大小的不同（凝胶过滤层析）进行纯化。分离原理的正交关系使得用于纯化无标签蛋白和天然含量丰富的蛋白的强有力的纯化方案成为可能。

-  如果对目的蛋白一无所知，用离子交换层析-疏水作用层析-凝胶过滤层析组合策略。这个组合可以被认为是标准方案。
-  考虑既使用阴离子交换层析又使用阳离子交换层析来在同一种纯化策略中获得不同的选择性。也考虑纯化方案的顺序，这通常也会使纯化有很大不同。

离子交换层析是一种既能使用阳离子又能使用阴离子而提供不同选择性的技术。目的蛋白可能在相同pH下对两种离子交换介质都结合得很好。或者可以调节pH值，pH可以被改变用以改变样品成分的带电性质。因此，可以在同一个纯化策略中不止一次使用离子交换层析，把它用作捕获、中间纯化、精细纯化。在同一纯化方案中，离子交换层析可以高效地在捕获阶段作为低分辨率模式使用，也可以在精细纯化阶段作为高分辨模式使用。

-  如果目的蛋白能够经受住运行条件，并且不会与介质不可逆地结合或被介质变性，考虑使用反向作用层析作为精细纯化步骤。

反向作用层析根据疏水性来分离蛋白和多肽。反向作用层析是一种高分辨率的技术，需要使用有机溶剂。当不重要活性的收率和四级结构时，该技术可广泛用于检测纯度。因为很多蛋白会被有机溶剂变性，该技术不建议用于蛋白纯化，因为活性的回收和回到天然的四级结构会被折衷。然而，在精细纯化阶段，当大多数杂蛋白已被除去，尤其对于不易被有机溶剂变性的小分子蛋白，反向作用层析可能是最佳的选择。

CIPP不意味着所有的方案必须有三步纯化。例如捕获和中间纯化可以在单独的一步中实现，同样，中间纯化和精细纯化也可一步实现。类似的，纯度要求很低时，快速的捕获步骤对于达到要求的结果就足够了。对于纯化有医疗用途的蛋白，可能需要第四或第五步纯化来满足高纯度和安全要求。步骤的数目通常依赖于对纯度的依赖和蛋白的用途。

如下的例子描述用CIPP成功的纯化一个重组蛋白的应用。

应用案例

1. 用ÄKTAFLCTM系统三步纯化一个重组酶

这个例子用于展示当需要高纯度水平时所使用的最常用的纯化方案：离子交换层析用于捕获，疏水作用层析用于中间纯化，凝胶过滤层析用于精细纯化。

目标是获得高度纯化的脱乙酰氧基头孢菌素C合成酶（DAOCS），一种在大肠杆菌细胞质中过表达的对氧气敏感的酶。

这项工作的更详细描述可以在Application Note 18-1128-91中找到。

样品提取和净化

细胞重悬在基于Tris、pH7.5的裂解缓冲液中，用超声破碎。加入硫酸链霉素和聚乙烯亚胺沉淀蛋白。裂解物用离心的方法净化。在裂解缓冲液中加入EDTA、DTT、benzamidide-HCl和PMSF来抑制蛋白酶和使对氧气敏感的酶破坏最小。将样品保持在冰上也能降低蛋白酶的活力。

捕获

捕获阶段致力于快速从相对不稳定的目的蛋白中除去最有害的杂质。这和计算的DAOCS等电点（ $pI=4.8$ ）一起决定了选择阴离子交换层析。一些阴离子交换层析柱包括那些HiTrap IEX Selection Kit中的柱子，都被用作筛选以寻找最适合的介质（结果未显示）。优化捕获阶段（图77）使得用高流速的逐步洗脱从而加速纯化成为可能。

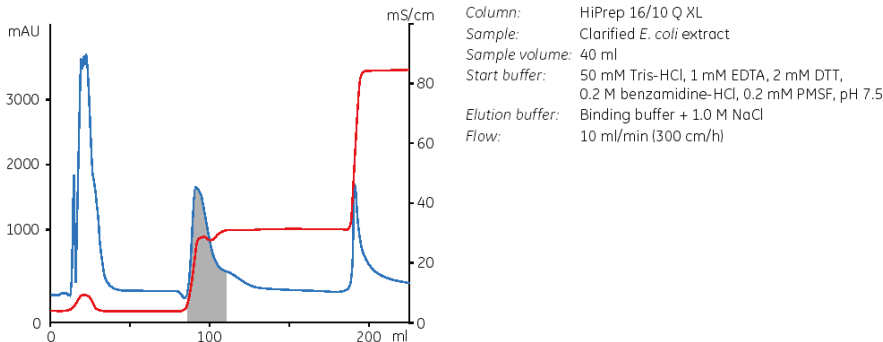


图77：用离子交换层析进行捕获。DAOCS的洗脱位置用阴影标记。

中间纯化

选择疏水作用层析是因为它与离子交换层析互补的纯化原理，也因为需要对样品条件所作的改动最小。疏水性质很难预测，通常建议筛选不同的介质。筛选后，根据所达到的分辨率选择了 RESOURCE ISO。在这个中间纯化步骤（见图78），为了达到更高的分辨率并显著减少杂质，牺牲了用于分离的最大可能流速。

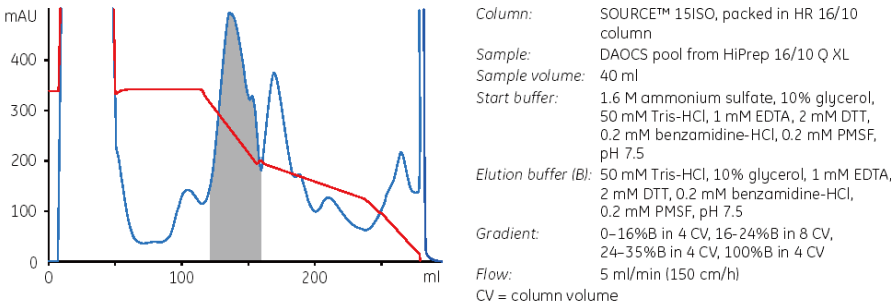


图78：用疏水作用层析进行中间纯化。DAOCS的洗脱位置用阴影标记。

精细纯化

精细纯化步骤的主要目的（见图79）是移除聚集和少量的杂质并把纯化的样品转移到适合于结构研究的缓冲液中。最后的产物被成功用于X-射线衍射实验。更详细的数据展示在1998年 Nature杂志的一篇论文上。[Structure of a cephalosporin synthase. Valegard, K., Terwisscha van Scheltinga, A.C., Lloyd, M., Hara, T., Ramaswamy, S., Perrakis, A., Thompson, A., Lee, H.J., Baldwin, J.E., Schofield, C.J., Hajdu, J. and Andersson, I. Nature 394, 805–809 (1998)]

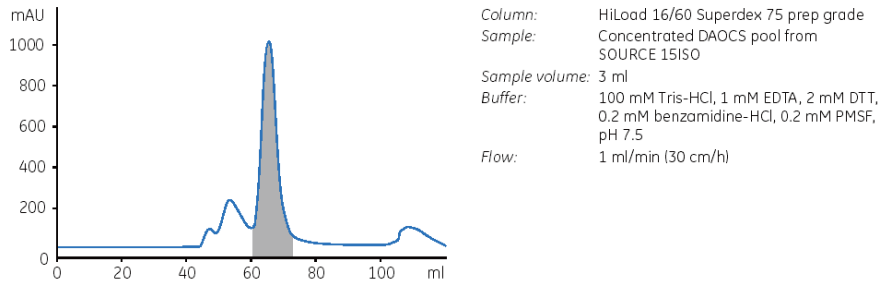


图79：用凝胶过滤层析进行精细纯化步骤。DAOCS的洗脱位置用阴影标记。

2. 用ÄKTAprime plus对重组的磷酸酶进行两步纯化

该应用的目的是生产纯的磷酸酶（rPhosphatase）并保持其生物学活性。磷酸酶基因在大肠杆菌中过表达的蛋白以可溶形式存在于细胞质中。使用ÄKTAprime plus上预编好的方法模板和预装的HiPrep和HiLoad柱子使快速简单的方法开发称为可能。纯化策略由离子交换层析作为捕获步骤，疏水作用层析作为中间纯化步骤，凝胶过滤层析作为精细纯化步骤。有活性的35mgrPhosphatase在8小时内纯化完毕。

本工作更详细的描述可以在Application Note 19-1142-32中找到。

样品制备和抽提

大肠杆菌细胞重悬在裂解缓冲液中，每克细胞加入10ml的裂解缓冲液（50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 2mM DTT, pH7.4）。重悬的细胞用超声破碎，6×20次超声，每次超声间有60秒的冷却。DNA用1%（w/v）的硫酸链霉素沉淀。样品在上样到第一根柱子前用离心净化，22000×g离心15分钟。

捕获

捕获阶段的主要目的是浓缩rPhosphatase，除掉最多的杂质。ÄKTAprime plus系统泵用来上样200ml净化后的提取物，以1:2的比例用水稀释，并上样到HiPrep 16/10 DEAE FF柱上。使用为离子交换层析编好的方法模板进行分离。

收集洗脱的组分并用酶联免疫检法检测碱性磷酸酶的活力（405nm的吸收）。含有rPhosphatase组分的纯度用SDS-PAGE确定。

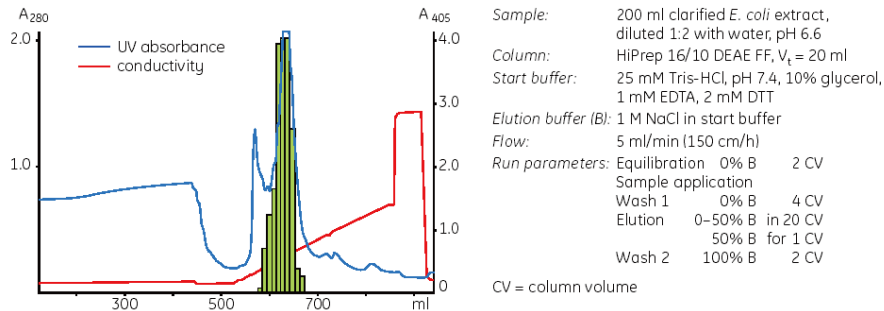


图80：用离子交换层析进行捕获。磷酸酶活力用绿色的条带表示（405nm的吸收）。

中间纯化

疏水作用层析用作中间纯化，因为它和含有高盐的样品兼容。从离子交换层析合并的组分用HiLoad 16/10 Phenyl Sepharose High Performance分离，所使用的是在ÄKTAprime plus上预先编好的方法模板。含有rPhosphatase的组分被合并，用50ml Amicon™搅拌浓缩罐使用Diaflow™ PM 10滤膜浓缩到10ml。降低样品体积使较小的凝胶过滤层析柱可以用来进行最终的精细纯化步骤。

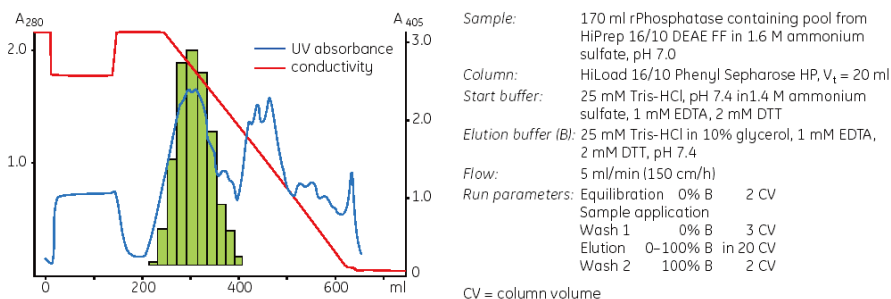


图81：用疏水作用层析进行中间纯化。磷酸酶活力用绿色的条带表示（405nm的吸收）。

精细纯化

最后的精细纯化步骤使用一个预编好的方法模板在HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade柱上进行分离。含有rPhosphatase的组分的纯度用SDS-PAGE（图82）和质谱检测（结果未显示）。

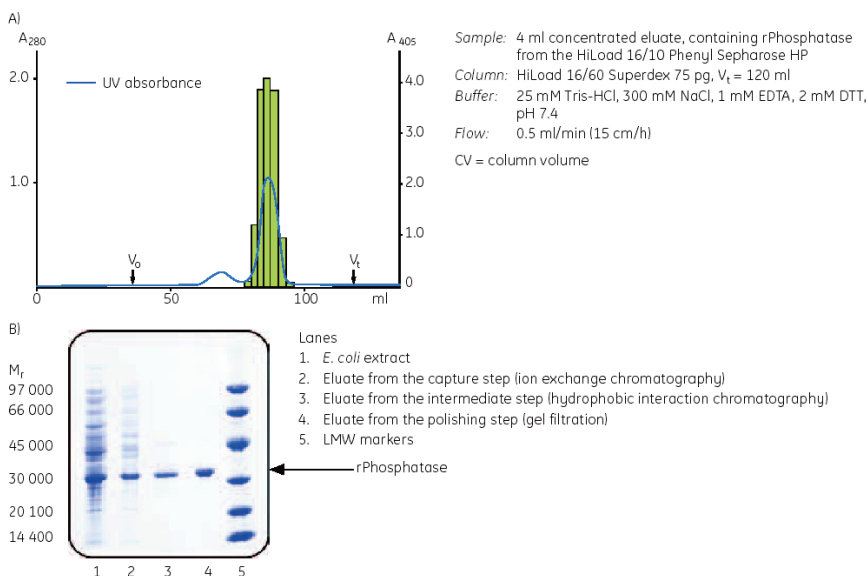


图82：（A）用凝胶过滤层析进行精细纯化步骤。磷酸酶活力用绿色的条带表示（405nm的吸收）。（B）用SDS-PAGE检测纯度。蛋白用考马斯亮蓝染色。

第十章 包涵体的处理

重组蛋白通常在细胞内表达，但有时蛋白也可分泌到细胞周质或外泌到培养液中。虽然蛋白的外泌有利于其折叠、溶解和二硫键的形成，但通常情况下在细胞内表达出的蛋白产量最高。

然而在细胞内聚集的重组蛋白通常以包涵体的形式堆积在一起，形成一些缺乏生物学活性、错误折叠的不溶聚合物。因此虽然从包涵体中分离蛋白经常碰到重新折叠和恢复其生物活性的困难，但包涵体的存在却使最初的纯化步骤变得非常简单。表25总结了处理包涵体形式的重组蛋白的优缺点，真核蛋白在细菌宿主中表达时经常会形成包涵体。

表25：包涵体的优缺点。

优点	缺点
高表达水平可以降低发酵成本	复性蛋白的步骤将困难和成本留至下游
表达可以方便的通过SDS-PAGE或免疫印迹和显微镜镜检监测（通常可以在细菌细胞中观察到包涵体黑色的颗粒）	表达不能通过功能检测直接监测
包涵体可以分离至高纯度，并直接用作抗原	次要的杂质通常是疏水性的、不易溶的膜蛋白和细胞壁片断
标签蛋白通常不能被蛋白酶切降解	主要的杂质通常是寡聚体，错误折叠的或部分降解的蛋白形式，较难分离。
包涵体中的小的标签蛋白能高效地复性	如果蛋白复性不好，就需要其它表达系统

如果蛋白表达成包涵体，可以考虑以下几种策略：尽可能优化可溶性表达方法、接受包涵体的形成同时研究使之溶解和复性的策略、尝试其它表达宿主、重新构建质粒。

包涵体的溶解

适当调整培养条件可以提高重组蛋白的溶解能力。

可以单独或组合地研究多个生长参数，有可能增加并未降解的标签蛋白的溶解性。研究步骤包括：

- 生长温度降低至20-30° C
- 增加通风
- 改变诱导条件

通常在细胞密度比较低（A600=0.5）时诱导能提高溶解的标签蛋白的产量，但有些情况下在细胞密度比较高（>1A600单位）时诱导较短时间或仅仅缩短诱导时间比较有利。使细胞密度较高和不诱导（比如使用IPTG）或减少诱导试剂的浓度（如将IPTG的浓度减少至0.1M）能够使产量降低，但这样能够使更多的标签蛋白表达出完整的形式。

- 如果改变培养条件不能显著提高可溶性蛋白的产量，则可以使用一些变性剂如4-6M的盐酸胍、4-8M的尿素、去污剂、碱性pH值（>9）、有机溶剂或N-十二烷基肌氨酸等溶解包涵体。
- 每种变性剂的溶解作用都受还原剂浓度、作用时间、温度、离子强度和变性剂与蛋白量比值的影响。溶解的蛋白在这个阶段通常可用与变性剂兼容的技术进行分离，在分离的同时也可进行纯化和复性，比如使用层析柱法复性。
- 变性剂存在情况下亲和纯化方法的成功应用取决于标签蛋白自身的性质。诸如盐酸胍、尿素、Tween20、CTAB或SDS等的变性剂一直在使用，但必须事先检测它们与目的蛋白的兼容性。

溶解的重组蛋白的复性

蛋白溶解之后必须正确折叠才能恢复其原本的功能，蛋白复性和形成正确的分子内缔合通常需要去除变性剂。蛋白复性比较关键的参数包括pH值、还原剂的存在、去除变性剂的速度、宿主蛋白和重组蛋白之间的相对浓度等。表26比较了层析柱法复性的不溶蛋白复性时常用的几种方法。

- 复性通常需要多方面优化条件，通常还要考虑其它方法（之前提到的一些），比如优化表达参数、重新构建克隆或者改变表达宿主等。

复性技术	优点/缺点
逐步透析	需要若干天。 使用大体积缓冲液。
稀释到接近中性pH	技术简单，稀释倍数大，通常几百倍稀释慢。
凝胶过滤层析	需要第二根柱子纯化。 通常每根柱子只能处理较小的体积。
柱上复性	需要第二根柱子纯化。 通常每根柱子只能处理较小的体积。

柱上复性

组氨酸标签蛋白能够使用简单有效的纯化和柱上复性方法，这种方法可获得具有所需生物学活性的可溶蛋白。图83所示的步骤已成功应用于一些带有组氨酸标签的不同蛋白。

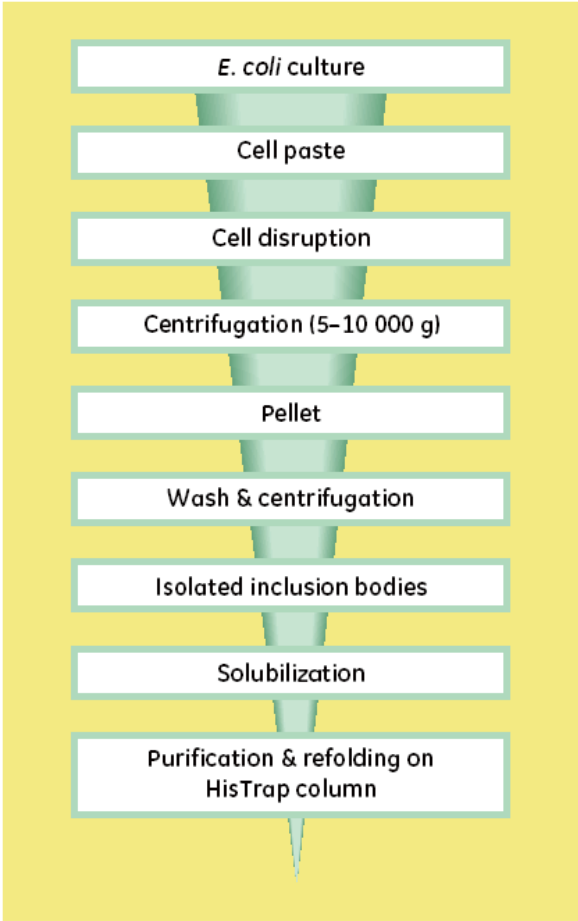


图83：提取、溶解和复性在大肠杆菌中表达成包涵体的带有6个组氨酸标签蛋白的一般流程。

高浓度的离液剂（如尿素或盐酸胍）能够增加组氨酸标签与固定的二价金属离子之间的结合，因此带有6个组氨酸标签的蛋白能够通过提取、溶解并与Ni Sepharose结合。可以在将蛋白从柱子上洗脱之前去除杂质并通过改变成非变性缓冲体系使其复性。复性之后的蛋白可根据需要使用其它方法进一步纯化（见第7章）。

应用

使用HisTrapFF 1ml和ÄKTAprime plus从100ml大肠杆菌中纯化并柱上复性不溶的组氨酸标签蛋白



这一过程使用HisTrap FF 1ml柱，也可使用HisTrap HP 1ml或HisTrap FF crude 1ml柱。

准备缓冲液



使用高纯度的水和化学试剂，将所有溶液在使用前用0.45 μ m滤膜过滤。

重悬缓冲液：20mM Tris-HCl, pH8.0

分离缓冲液：2M尿素，20mM Tris-HCl，0.5M 氯化钠，2%Triton-X100，pH8.0

结合缓冲液（A1端口）：6M盐酸胍，20mM Tris-HCl，0.5M 氯化钠，5mM咪唑，
1mM 2-巯基乙醇，pH8.0

溶解缓冲液（A2端口）：6M尿素，20mM Tris-HCl，0.5M 氯化钠，5mM咪唑，
1mM 2-巯基乙醇，pH8.0

洗脱缓冲液（A3端口）：20mM Tris-HCl，0.5M 氯化钠，0.5mM咪唑，
1mM 2-巯基乙醇，pH8.0

复性缓冲液（B端口）：20mM Tris-HCl，0.5M 氯化钠，5mM咪唑，
1mM 2-巯基乙醇，pH8.0

每种洗脱物至少准备500ml



另外可以选用的结合溶液：可在结合溶液中加入5-40mM咪唑以降低不带组氨酸标签的蛋白的非特异结合。咪唑的浓度取决于蛋白自身，如果目的蛋白在某些咪唑浓度下被洗脱，不与柱子结合，则应降低咪唑的浓度。

破坏、洗涤、分离包涵体

1. 每100ml培养液得到的菌体用4ml重悬缓冲液重悬。
2. 在冰浴中超声破碎细胞（如4×10秒）。
3. 4° C高速离心10分钟。
4. 去除上清，用3ml冰冷的提取缓冲液重悬沉淀，之后用上述方法超声。
5. 4° C高速离心10分钟。
6. 重复步骤4和5。



在这一过程中可以用不含尿素的溶液洗涤一次沉淀，随后冷冻保存以备后用。

溶解和准备样品

1. 用5ml结合缓冲液重悬沉淀。
2. 室温搅拌30-60分钟。
3. 4° C高速离心15分钟。
4. 将样品用0.45μm滤膜过滤以除去可能存在的微粒。

 每种蛋白所需2-巯基乙醇的最佳浓度（0-20mM）应通过实验方法确定。

 如果不按上述方法准备，可以用结合缓冲液稀释样品或使用HiTrap Desalting或HiPrep 26/10 Desalting更换溶液，使样品适应结合缓冲液的成分，之后将样品用0.45 μ m滤膜过滤

准备系统

 复性和洗脱所需的线性梯度使得层析系统的使用特别重要。

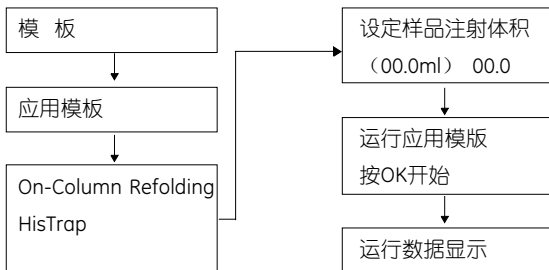
 以使用ÄKTAprime plus为例。体系一旦准备好，余下的步骤（在选用的应用模版和开始方法条件下）可以自动进行。

1. 将A端口（8孔阀）的每个出口管连入上面的洗脱物中，B端口（2孔阀）的出口管连入洗脱缓冲液中。
2. 将三个棕色的废液管连至废液。
3. 将柱子注射阀（7孔阀）上的端口1与紫外检测器连接。
4. 将18毫米管（最少40个）放入收集管架中，并使分级臂上的白色盘对着第一管。
5. 在端口2和6之间连接上样环，上样环的体积对样品来说需要足够大。使用注射器手动填满上样环。

注意：如果需要Superloop，使用说明中提供了Superloop的附加说明。

选择应用模板并启动方法

1. 检查与PrimeView的连接。屏幕右下角应该显示文字“Controlled by prime”
2. 使用箭头和OK按钮在菜单树中移动直到找到On-Column Refolding HisTrap



3. 输入样品体积并按OK启动模板。

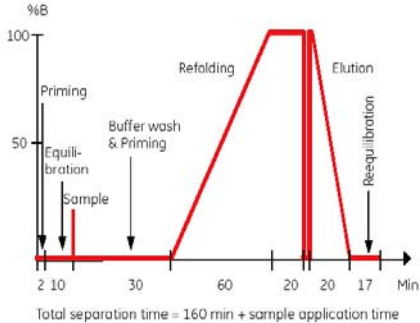


图84：柱上复性HisTrap应用模板的理论梯度。

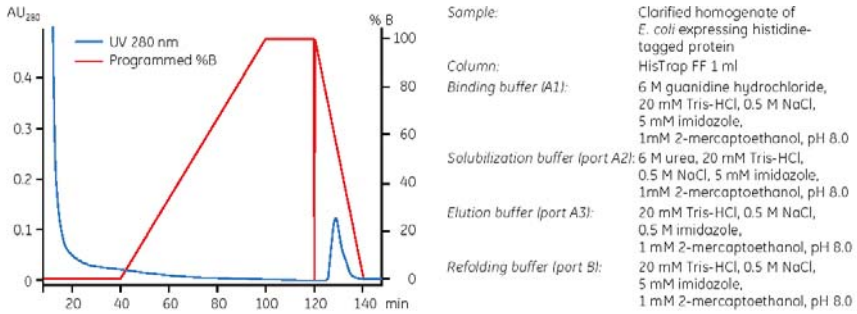


图85：组氨酸标签蛋白柱上复性的典型结果。

情况	可能原因	解决方法
柱压高	柱子堵塞 系统堵塞	根据说明清洗柱子或换用新的柱子。确保样品已经离心和/或经0.45μm滤器过滤。
不结合		将柱子换成一段空连接管。检查压力。如果背压>0.3MPa，根据手册清洁系统。
无洗脱		- 检查使用的柱子正确 - 检查每种溶液的进口管都与正确的进口端连接 - 检查选用了正确的方法程序 - 检查缓冲液的pH值和成分正确 - 检查样品已经被调节适应结合缓冲液的条件
		- 检查每种溶液的进口管都与正确的进口端连接 - 检查选用了正确的方法程序 - 检查缓冲液的pH值和成分正确 - 根据柱子说明换用其它的洗脱条件 - 通过观察液体从系统出口的流出检查缓冲液的流动

第十一章 脱盐和缓冲液更换

脱盐柱为从样品中去除盐或其它小分子和更换其缓冲液成分提供了一个简单快捷的方法。这一技术同样能够用于将盐浓度调高或去除后续所用材料中不需要的添加剂。这些柱子填充有 Sephadex™ G-25，它是一种凝胶过滤产品，能够以大小为基础分离分子。脱盐与透析相比有诸多优势，透析通常比较慢，需要大量体积的溶液，并且在处理过程中经常伴随有原料的损失，因为样品可能会被蛋白水解性破坏、聚集或非特异性结合在透析膜上。

脱盐柱可以在很短的时间内将样品一步脱盐、转移至新的溶液中并除去小分子量的物质。这种柱子也可用来为结束反应而迅速除去一些试剂。

样品体积达到脱盐柱总体积的30%时即可使用脱盐柱。这种高速度高容量的分离允许快速有效地处理更多体积的样品。只要在正常水溶液条件下蛋白的浓度不超过约70mg/ml，并且该蛋白在这样的浓度下稳定并且可溶，样品的浓度就不会对分离产生影响。表27给出了一些预装、即用的脱盐柱和缓冲液更换柱的选用指南。

表27： 脱盐/缓冲液更换柱的选用指南。

柱子	柱材	上样体积 (ml)	洗脱体积(ml)	稀释倍数	操作
NAPTM-5	Sephadex G-25 DNA级	0.1	0.5	5	重力
		0.25	0.7	2.8	重力
		0.5 (最多)	1.0	2	重力
NAP-10	Sephadex G-25 DNA级	0.75	1.2	1.6	重力
		1.0 (最大)	1.5	1.5	重力
PD-10脱盐	Sephadex G-25中等	1.5	3.5	1-1.5	重力
		2.0	3.5	1-1.3	重力
		2.5 (最大)	3.5	1-1.3	重力
HiTrap脱盐	Sephadex G-25 超精细	0.25	1.0	4	注射器/泵
		0.5	1.5	3	注射器/泵
		1.0	2.0	2	注射器/泵
		1.5 (最大)	2.0	1.3	注射器/泵
2× HiTrap Desalting	Sephadex G-25 超精细	3.0 (最大)	4-5	1.3-1.7	注射器/泵
3× HiTrap Desalting	Sephadex G-25 超精细	4.5 (最大)	6-7	1.3-1.7	注射器/泵
HiPrep 26/10 脱盐	Sephadex G-25精细	10	10-15	1-1.5	泵
		15 (最大)	15-20	1-1.3	泵
2× HiPrep 26/10 脱盐	Sephadex G-25精细	30 (最大)	30-40	1-1.2	泵
3× HiPrep 26/10 脱盐	Sephadex G-25精细	45 (最大)	45-55	1-1.2	泵
4× HiPrep 26/10 脱盐	Sephadex G-25精细	60 (最大)	60-70	1-1.2	泵

更大体积样品脱盐

可将最多五个HiTrapDealting脱盐柱串联起来以增加其样品容量，如两个柱子，样品体积3ml；五个柱子，样品体积7.5ml。

可将最多四个HiPrep 26/10 Dealting脱盐柱串联起来以增加其样品容量，如两个柱子，样品体积30ml；四个柱子，样品体积60ml。即使四个柱子串联起来处理样品也仅需要20-30分钟。

准备缓冲液

对于含有带电基团的样品，推荐使用含有盐成分的洗脱液。推荐盐浓度至少为25mM以阻止与基质之间可能存在的离子反应。这种情况下通常使用氯化钠，缓冲液中含25-50mM的缓冲物质即可。

盐浓度高于1.0M时疏水物质可能会滞留或结合在基质上。

更高浓度的盐[>1.5M硫酸铵]时填充柱会收缩。

准备样品

只要样品的粘度与在所用的缓冲液的粘度差别小于1.5，样品浓度就不会对分离产生影响。这相当于正常缓冲液中70mg/ml的蛋白或5mg/ml的高分子量多聚物如右旋糖苷。

样品应当充分溶解，需要的话可在上样前离心或过滤（0.45μm滤器）以除去颗粒物。

蛋白的溶解性通常取决于pH值和/或离子强度（盐浓度），因此更换缓冲液可能会引起蛋白沉淀。并且如果pH值的改变超出了蛋白的活性范围蛋白将会丧失活性。

下述的步骤介绍了使用PD-10 Desalting、HiTrap Desalting和HiPrep 26/10 Desalting脱盐和更换缓冲液。

PD-10 Desalting

PD-10 Dealtling脱盐柱填充有Sephadex G-25基质，用于通过脱盐和更换缓冲液从低分子量（ $Mr<1000$ ）物质中分离高分子量（ $Mr>5000$ ）物质。基质填充在两块烧熔的聚乙烯多孔板之间，这两块玻璃保护基质在重力流的作用下不至于流干，柱子的出口用可重复使用的盖子密封上。每个柱子能够通过重力流处理最多2.5ml体积的样品，多个样品能够并行处理。推荐使用大量基质的PD-10柱子进行通用的样品制备。

这些柱子和柱子支架（PD-10 Desalting Workmate）一同包装。也提供LabMate缓冲液池用来进行简单的平衡。

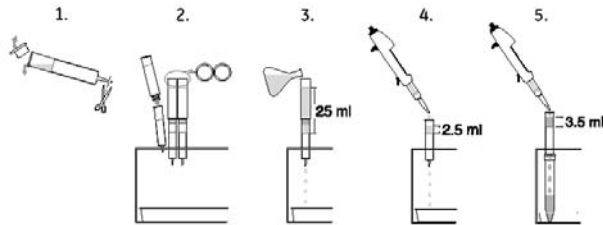


图86：PD-10脱盐柱的使用方法示意图。（1）准备柱子；（2）LabMate缓冲池附件，（3）柱平衡，（4）加样品，（5）洗脱和收集样品。

1. 剪断底部尖端，移除顶盖并倒出多余的液体。
2. 如果条件允许，将LabMate缓冲液池放在PD-10柱子顶部，把柱子放在PD-10 Desalting WorkMate上。
3. 用大约25ml的缓冲液平衡柱子，弃去穿透（可用塑料盘收集穿透）。
4. 加入总体积为2.5ml的样品。如果样品体积少于2.5ml，加入缓冲液直到体积达到2.5ml。弃去穿透。
5. 用3.5ml的缓冲液洗脱并收集流出液。典型的分离过程见图87所示。

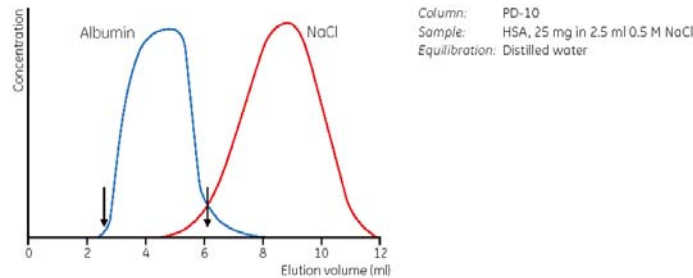


图87：从白蛋白溶液中去掉氯化钠。PD-10脱盐柱用蒸馏水平衡。样品中含有人血清白蛋白（25mg）溶于2.5ml 0.5M 的氯化钠溶液中。共有23.8mg白蛋白在3.5ml洗脱物中被回收，相应的产率为95.3%（箭头之间）。脱盐之前样品中起始的盐总量为2.0%。

HiTrap Desalting



图88: HiTrap Desalting使用注射器或泵使得分离更有效且易于操作。

HiTrap Desalting脱盐柱是一个填装有广为人知的凝胶排阻基质Sephadex G-25 Superfine的5ml柱子。该基质以交联的右旋糖苷珠为基础，能够获得出色的分辨率和很高的流速。对球蛋白的分级分离范围在分子量1000到5000之间，排阻界限大概为Mr5000。这样确保能够从分子量低于1000的分子中分离分子量高于5000的蛋白/多肽。

HiTrap脱盐柱能用于pH范围在2-13之间的水溶液，它在所有经常使用的溶液、尿素（8M）和盐酸胍（6M）溶液以及所有非离子和离子型去污剂中都比较稳定。在缓冲液和样品中也可使用低级醇（甲醇、乙醇、丙醇），但我们推荐将它们的使用浓度控制在25v/v%以下。应避免长时间（数小时）暴露在pH值低于2或高于13或氧化剂的环境中。

当需要完全去除低分子量成分时，推荐的样品体积范围在0.1-1.5ml。在1-10ml/min流速的范围内分离不受流速的影响，推荐使用的最高流速为15ml/min。这种柱子不能被拆开或重新填充。

使用注射器、泵或诸如ÄKTA design系统的层析系统可以非常方便地进行分离。可以将多达五个柱子串连起来使用以增加可处理的样品体积。参考第197页关于体系放大选择的进一步讨论。

图89显示了一种典型的使用HiTrap脱盐柱进行脱盐和溶液更换分离，通过UV吸收和电导率的变化进行监测。

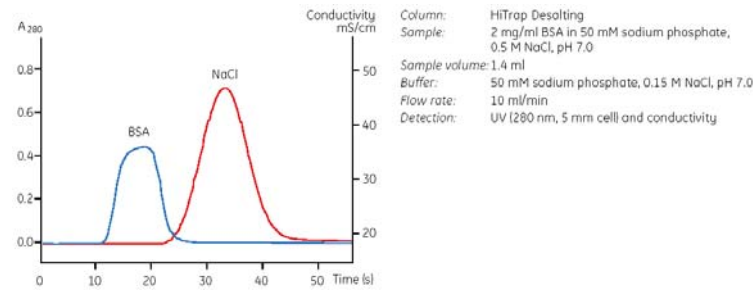


图89: 使用HiTrap Desalting脱盐在30分钟内高效脱盐。

 为避免交叉污染，柱子只能在相同类型的样品间使用。

柱平衡

- 1. 将注射器或泵管装满缓冲液，移开塞子。将柱子连接在注射器（通过连接器）或泵管上，为避免将空气引入柱子，连接过程中要始终保持有水存在。
 - 2. 掰掉柱子出口的封口。
 - 3. 用25ml缓冲液以5ml/min的速度洗涤柱子以完全去除存储液，存储液含有20%的乙醇。如果柱中留有空气，用去除气体的缓冲液洗涤直到空气消失。在加样品过程中因意外引入柱中的空气不影响分离。
- 注意：5ml/min相当于使用HiTrap 5ml柱时约每分钟120滴。

使用注射器手动脱盐

- 1. 为使用注射器操作，将注射器与柱子用提供的Luer连接器连起来。
- 2. 平衡柱子，见上面 柱平衡。
- 3. 使用2-5ml的注射器以1-10ml/min之间的流速加样品，弃去柱子中流出的液体。如果样品体积少于1.5ml，换用缓冲液，继续注射直到总体积达到1.5ml，弃去流出液。
- 4. 选用表28所示合适体积的缓冲液洗脱蛋白。用指定的体积收集脱盐后的蛋白。

 推荐的样品体积最多为1.5ml（当使用一个HiTrap脱盐5ml柱时）。减少上样到柱子的样品体积所产生的效果见表28所示。

表28：使用注射器推荐的样品和洗脱的体积，给出了脱盐后样品典型的产率和残留盐含量。

样品上样体积 (ml)	加入缓冲液 (ml)	洗脱和收集体积 (ml)	产量 (%)	残余的盐 (%)	稀释倍数
0.25	1.25	1.0	>95%	0.0	4.0
0.5	1.0	1.5	>95%	<0.1	3.0
1.0	0.5	2.0	>95	<0.2	2.0
1.5	0.0	2.0	>95	<0.2	1.3

 柱子的空隙体积是1.5ml，高分子量成分洗脱体积在1.5ml到4.5ml之间，取决于样品体积。低分子量成分在3.5ml后才开始洗脱。

注意：某些类型的分子，如小的杂环或同环芳香族化合物（嘌呤、嘧啶、染料）能够与Sephadex作用因此它们会比预期洗脱得慢。在这些情况下可以使用更大体积的样品，但每种情况都必须使分离经过优化。

使用泵脱盐

- 1. 平衡柱子，见柱平衡。
- 2. 最多加入1.5ml样品，用UV检测监控器和/或电导监控器监测柱子中的流出物。保持流速在1-10ml/min的范围内，收集组分。
- 3. 在应用于下一个样品之前用大约10ml的缓冲液洗涤柱子。收集组分。

用ÄKTAprime plus脱盐

ÄKTAprime plus包含单独HiTrap脱盐柱和HiPrep脱盐26/10柱的预排程序模板。下述的步骤使用HiTrap脱盐5ml柱。

准备溶液

 使用高纯度的水和试剂，并且所有溶液在使用前都要用0.45 μm的滤膜过滤。

溶液（A1端口）：20mM磷酸钠，0.15M 氯化钠，pH7.0 至少准备500ml所需的溶液

准备样品

将样品用0.45μm的滤膜过滤。

 推荐样品的最大体积为1.5ml。

准备ÄKTAprime plus

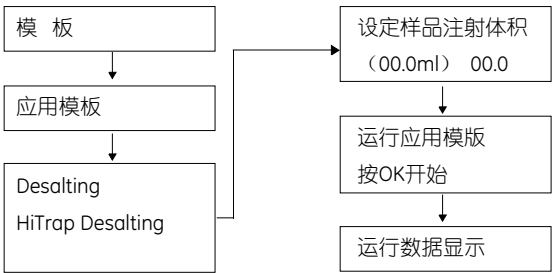
 一旦准备好系统，剩下的步骤（在Selecting Application Template和开始方法）将自动进行。

1. 将端口A（8孔阀）的进口管和端口B（2孔阀）放入缓冲液中。
2. 将三个褐色的废液管放入废液中。
3. 将柱子注射阀（7孔阀）上的端口1与UV检测器连接。
4. 将18毫米管（最少20个）放入收集管架中，并使分级臂上的白色触片紧靠在第一管。
5. 在上样阀的2号和6号端口间连接上样环，上样环的体积和样品相比要足够大。用注射器手动填装上样环。

注：如果使用Superloop，额外还需要参照Superloop附带的说明书。

选择应用模板并启动方法

1. 检查与PrimeView的连接。屏幕右下角应该显示文字“Controlled by prime”
2. 使用箭头和OK按钮在菜单树中移动直到找到Desalting HiTrap Desalting。



3. 输入样品体积并按OK启动模板。

图90显示了理论的脱盐层析图，图91显示了一种组氨酸标签蛋白更换溶液得到的典型结果。UV和电导追踪使得合适的脱盐组分被收集合并。

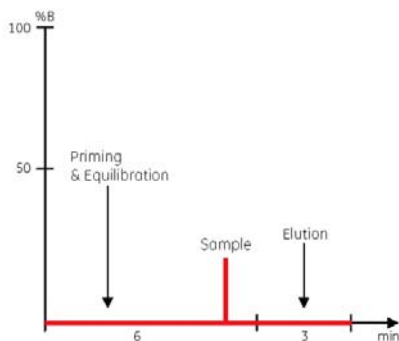


图90：脱盐、HiTrap脱盐应用模板中的理论梯度。全部分离时间=9分钟+样品上样时间。

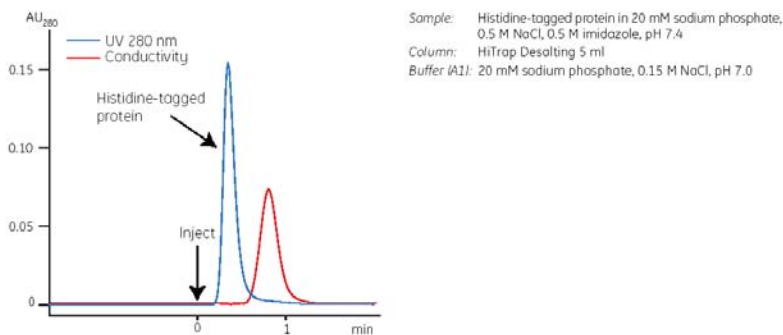


图91：一种组氨酸标签蛋白更换溶液的典型结果。

规模化放大

为分离体积超过1.5ml的样品，或者增加高分子量和低分子量成分之间的分辨率，可以将多达五个HiTrap脱盐柱串联起来（见表27）。对于使用注射器操作，应当维持表28中推荐的流速并按比例增加体积。样品的稀释度取决于样品的体积和串联柱子的数目。能够获得低于表28所示的稀释倍数，但是对每种样品体积和串联柱子数目的结合必须使洗脱体积最优化。每个柱子的背压在10ml/min时大约是0.25bar。对于体积不超过15ml的样品，可使用HiPrep 26/10脱盐柱（见下面）。假设样品的粘度与洗脱物相同（见表27）时，可将最多四个HiPrep 26/10脱盐柱串联起来而不会超过极限压力（多达60ml样品体积）。

HiPrep 26/10 Desalting



图92: 60ml样品可以在四个串联的HiPrep 26/10脱盐柱中运行。

HiPrep 26/10 Desalting脱盐柱填充有Sephadex G-25 fine, 它能够从低分子量物质 ($M_r < 1000$) 中组分离高分子量物质 ($M_r > 5000$), 每个柱子允许15ml样品可靠且可重复的脱盐和缓冲液更换。对于30-60ml的样品可将2-4个柱子串联使用。详细信息见表27。

ÄKTAprime plus和HiPrep 26/10脱盐柱上缓冲液更换

准备溶液



使用高纯度的水和试剂，并且所有溶液在使用前都要用0.45 μm的滤器过滤。

溶液 (A1端口): 20mM磷酸钠, 0.15M氯化钠, pH7.0至少准备500ml所需的溶液

准备样品

将样品用0.45μm的滤膜过滤。



推荐样品的最大体积为15ml。

准备ÄKTAprime plus

一旦准备好系统，剩下的步骤（在Selecting Application Template下开始方法）将自动进行。

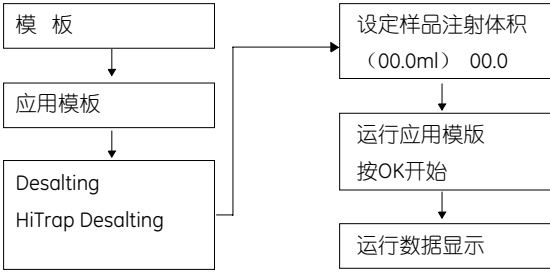
1. 将端口A（8孔阀）的进口管和端口B（2孔阀）放入缓冲液中。
2. 将三个褐色的废液管放入废液中。
3. 将柱子注射阀（7孔阀）上的端口1与UV检测器连接。
4. 将18毫米管（最少20个）放入收集管架中，并使分级臂上的白色触片紧靠在第一管。

5. 在上样阀的2号和6号端口间连接上样环，上样环的体积和样品相比要足够大。用注射器手动填装上样环。

注：如果使用Superloop，额外还需要参照Superloop附带的说明书。

选择应用模板并启动方法

1. 检查与PrimeView的连接。屏幕右下角应该显示文字“Controlled by:prime”
2. 使用箭头和OK按钮在菜单树中移动直到找到Desalting HiTrap Desalting。



3. 输入样品体积并按OK启动模板。

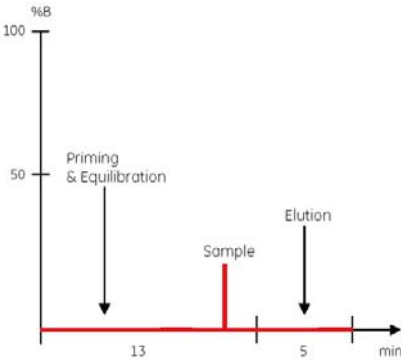


图93：脱盐、HiTrap脱盐应用模板中的理论梯度。全部分离时间=18分钟+样品上样时间。

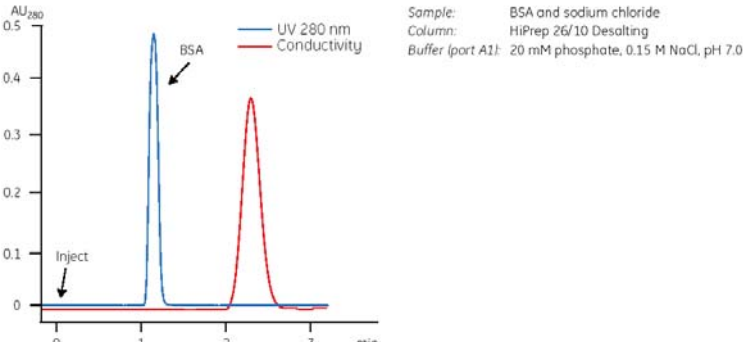


图94：BSA更换溶液的典型结果。

附录1 Ni Sepharose和未装载离子的IMAC Seppharose产品的特征

Ni Sepharose 产品

推荐使用Ni Sepharose High Performance 高分辨纯化组氨酸标签蛋白，使用该产品能够得到尖峰和浓的洗脱蛋白。Ni Sepharose 6 Fast Flow非常适合规模放大和批量纯化。

表29总结了大量Ni Sepharose基质的主要特征，表30列出了这些基质在不同条件下的稳定性，表31至37分别总结了同种基质在预装柱和预装96孔板中的特征，详细信息见第3章。

表29： Ni Sepharose High Performance和Ni Sepharose 6 Fast Flow的特征。

性质	Ni Sepharose High Performance	Ni Sepharose 6 Fast Flow
基质状	6%高度交联的琼脂糖，预装载了Ni ²⁺	6%高度交联的琼脂糖，预装载了Ni ²⁺
金属离子结合能力	大约每毫升柱材15 μ mol Ni ²⁺	大约每毫升柱材15 μ mol Ni ²⁺
平均颗粒大小\	34 μ m	90 μ m
动态结合能力 ¹	每毫升柱材至少40mg 6组氨酸标签蛋白	每毫升柱材至少40mg 6组氨酸标签蛋白
建议流速 ²	<150cm/h	50-400cm/h
使用时的相容性	在所有通常使用的缓冲液、还原剂和去污剂中都比较稳定。更多信息见表30。	在所有通常使用的缓冲液、还原剂和去污剂中都比较稳定。更多信息见表30。
化学稳定性 ³	在40oC检测过1周：0.01M 盐酸, 0.1M 氢氧化钠。 检测过12小时：1M氢氧化钠， 70% 乙酸。 检测过30分钟：30%异丙醇。 检测过1小时：2% SDS	在40oC检测过1周：0.01M 盐酸, 0.1M 氢氧化钠。 检测过12小时：1M氢氧化钠， 70% 乙酸。 检测过30分钟：30%异丙醇。 检测过1小时：2% SDS
pH 稳定性 ³	短期（≤2小时）2-14	短期（≤2小时）2-14
	长期（≤1周）3-12	长期（≤1周）3-12
储存	20%乙醇	20%乙醇
储存温度	4-30°C	4-30°C

¹动态结合能力条件：

样 品：1mg/ml 结合缓冲液中带有6个组氨酸标签的纯蛋白（分子量43000）或从大肠杆菌裂解物中结合的6个组氨酸标签的蛋白（分子量28000）。载量是在有10%穿透时计算。

柱体积：0.25ml或1ml

流 速：分别是0.25ml/min或1ml/min

结合缓冲液：20mM磷酸钠，0.5M 氯化钠，5mM咪唑，pH 7.4

洗脱缓冲液：20mM磷酸钠，0.5M 氯化钠，0.5mM咪唑，pH 7.4

注：动态结合能力取决于蛋白自身。

²室温时水

³剥离Ni²⁺的基质

表30： 相容性指南： Ni Sepharose High Performance和Ni Sepharose 6 Fast Flow在这些成分中至少在指定的浓度下比较稳定。

化合物	浓度
还原剂1	5mM DTE 5mM DTT 20mM β -巯基乙醇 5mM TCEP 10mM 还原型谷胱甘肽
变性剂	8M尿素2 6M盐酸胍2
去垢剂	2% Triton X-100（非离子） 2% Tween 20（非离子） 2% NP-40（非离子） 2% cholate （阴离子） 1% CHAPS（两性离子）
其它添加剂	20% 乙醇 50% 甘油 500mM 咪唑 100mM Na2SO4 1.5M 氯化钠 1mM EDTA3 60mM 柠檬酸2
缓冲液	50mM 磷酸钠， pH7.4 100mM Tris-盐酸， pH7.4 100mM Tris-HAc， pH7.4 100mM HEPES， pH7.4 100mM MOPS， pH7.4 100mM 醋酸钠， pH42

¹ 运行含有还原剂的样品/缓冲液之前应先空白运行去除还原剂的结合缓冲液和洗脱缓冲液，见第33页。

²在40° C检测一周。

³1mM的强螯合剂EDTA曾在某些情况下成功使用，一般认为应谨慎使用螯合剂（并且只能用于样品而不能用在缓冲液中）。任何金属离子的剥离都可以通过在离心/过滤前往样品中加入稍微过量的氯化镁来中和。注意剥离的效果可能因样品体积的不同而有所差异。

表31: His MultiTrap HP和His MultiTrap FF的特征。

介质	His MultiTrap HP: Ni Sepharose High Performance His MultiTrap FF: Ni Sepharose 6 Fast Flow
过滤板大小 ¹	127.8×85.5×30.6mm
过滤板材料	聚丙烯和聚乙烯
结合能力 ²	His MultiTrap HP: 每孔至多1mg组氨酸标签蛋白 His MultiTrap FF: 每孔至多0.8mg组氨酸标签蛋白
孔间可重复性	+/-10%
每孔装载体积	50 µl
孔数	96
孔体积	800 µl
最大样品上样体积	600 µl
pH稳定性 ³	2-14（短期），3-12（长期）
储存	20% 乙醇
储存温度	4-30°C

¹ 根据ANSI/SBS1-2004, 3-2004和4-2004标准（ANSI为美国国家标准，SBS为生物分子筛选协会）。

² 蛋白的结合能力取决于蛋白自身。

³ 剥离Ni²⁺的基质。

表32: His SpinTrap的特征。

介质	Ni Sepharose High Performance
平均颗粒大小	34 µm
柱床体积	100 µl
柱子材料	聚丙烯管和聚乙烯膜
柱子结合能力 ¹	每根柱子大约0.75mg 组氨酸标签蛋白
使用过程中的兼容性	在所有通常使用的缓冲液、还原剂、变性剂和去垢剂中稳定。 更详细的信息见表30。
保存	0.15% Kathon CG
保存温度	4-30°C

¹ 蛋白的结合能力取决于蛋白自身。

表33: HisTrap和HisTrap FF的特征。

柱材	HisTrap HP: Ni Sepharose High Performance HisTrap FF: Ni Sepharose 6 Fast Flow
柱体积	1ml和5ml
柱子大小	0.7×2.5cm (1ml) ; 1.6×2.5cm(5ml)
动态结合能力 ¹	1HisTrap HP: 每毫升柱材至少40mg组氨酸标签蛋白。 HisTrap HP: 每毫升柱材大约40mg组氨酸标签蛋白。
建议流速	1ml/min (1ml) ; 5ml/min (5ml)
最大流速 ²	4ml/min (1ml) ; 20ml/min (5ml)
最大压力 ²	0.3MPa, 3bar
pH稳定性 ³	2-14 (短期), 3-12 (长期)
兼容性	在所有通常使用的缓冲液、还原剂、变性剂和去垢剂中稳定。 更详细的信息见表30。
化学稳定性 ³	在40oC检测过1周: 0.01M 盐酸, 0.1M 氢氧化钠。 检测过12小时: 1M 氢氧化钠, 70% 乙酸。 检测过30分钟: 30%异丙醇。 检测过1小时: 2% SDS
储存	20%乙醇
储存温度	4-30°C

¹动态结合能力条件:

样 品: 1mg/ml 结合缓冲液中带有6个组氨酸标签的纯蛋白 (分子量43000) 或从大肠杆菌裂解物中结合的6个组氨酸标签的蛋白 (分子量28000)。载量是在有10%穿透时计算。

柱体积: 0.25ml或1ml

流 速: 分别是0.25ml/min或1ml/min

结合缓冲液: 20mM磷酸钠, 0.5M 氯化钠, 5mM咪唑, pH 7.4

洗脱缓冲液: 20mM磷酸钠, 0.5M 氯化钠, 0.5mM咪唑, pH 7.4

注: 动态结合能力取决于蛋白自身。

²室温时水

³剥离Ni²⁺的基质

表34： HisTrap FF crude的特征。

介质	Ni Sepharose 6 Fast Flow
平均颗粒大小	90 μ m
柱床体积	1ml和5ml
柱子大小	0.7×2.5cm（1ml）； 1.6×2.5cm（5ml）
动态结合能力 ¹	每毫升柱材大约40mg组氨酸标签蛋白。
建议流速	1ml/min（1ml）； 5ml/min（5ml）
最大压力 ²	0.3MPa， 3bar
pH稳定性 ³	2-14（短期）， 3-12（长期）
使用过程中的兼容性	在所有通常使用的缓冲液、还原剂、变性剂和去垢剂中稳定。 更详细的信息见表30。
化学稳定性 ³	在40oC检测过1周： 0.01M 盐酸, 0.1M 氢氧化钠。 检测过12小时： 1M 氢氧化钠， 70% 乙酸。 检测过30分钟： 30%异丙醇。 检测过1小时： 2% SDS
储存	20%乙醇
储存温度	4-30℃

¹动态结合能力条件：

样 品： 1mg/ml 结合缓冲液中带有6个组氨酸标签的纯蛋白（分子量43000）或从大肠杆菌裂解物中结合的6个组氨酸标签的蛋白（分子量28000）。载量是在有10%穿透时计算。

柱体积： 0.25ml或1ml

流 速： 分别是0.25ml/min或1ml/min

结合缓冲液： 20mM磷酸钠， 0.5M 氯化钠， 5mM咪唑， pH 7.4

洗脱缓冲液： 20mM磷酸钠， 0.5M 氯化钠， 0.5mM咪唑， pH 7.4

注： 动态结合能力取决于蛋白自身。

²室温时水

³剥离Ni²⁺的基质

表35： HisTrap FF crude试剂盒的组分和特征。

试剂盒组成	3×1毫升HisTrap FF crude 柱子 ¹ 2×50毫升磷酸缓冲液， 8× 储液， pH7.4 50ml 2M咪唑， pH7.4 1根注射器， 5ml 接头 说明书
-------	---

¹HisTrap FF crude柱子的特征见表34。

表36： His GraviTrap的特征。

介质	Ni Sepharose 6 Fast Flow
平均颗粒大小	90 μ m
柱床体积	1ml
柱子材料	聚丙烯管和聚乙烯膜
柱子结合能力 ¹	每根柱子大约40mg 组氨酸标签蛋白
使用过程中的兼容性	在所有通常使用的缓冲液、还原剂、变性剂和去垢剂中稳定。 更详细的信息见表30。
化学稳定性 ³	在40°C检测过1周： 0.01M 盐酸, 0.1M 氢氧化钠。 检测过12小时： 1M 氢氧化钠， 70% 乙酸。 检测过30分钟： 30%异丙醇。 检测过1小时： 2% SDS
储存	20%乙醇
储存温度	4-30°C

¹蛋白结合能力取决于蛋白自身。

²剥离Ni²⁺的基质

表37： HisPrep FF 16/10的特征。

介质	Ni Sepharose 6 Fast Flow
柱床体积	20ml
柱子大小	1.6×10cm
动态结合能力 ¹	每毫升柱材大约40mg组氨酸标签蛋白。
建议流速 ²	2-10ml/min（60-300cm/h）
最大流速 ²	10ml/min（300cm/h）
最大压力 ²	1.5bar, (0.15MPa, 22psi)
柱管最大压力	5bar (0.5Mpa, 73psi)
使用过程中的兼容性	在所有通常使用的缓冲液、还原剂、变性剂和去垢剂中稳定。 更详细的信息见表30。
化学稳定性 ³	在40oC检测过1周：0.01M 盐酸, 0.1M 氢氧化钠。 检测过12小时：1M 氢氧化钠, 70% 乙酸。 检测过30分钟：30%异丙醇。 检测过1小时：2% SDS
储存	20%乙醇
储存温度	4-30°C

¹动态结合能力条件：

样 品：1mg/ml 结合缓冲液中带有6个组氨酸标签的纯蛋白（分子量43000）或从大肠杆菌裂解物中结合的6个组氨酸标签的蛋白（分子量28000）。载量是在有10%穿透时计算。

柱体积：0.25ml或1ml

流 速：分别是0.25ml/min或1ml/min

结合缓冲液：20mM磷酸钠，0.5M 氯化钠，5mM咪唑，pH 7.4

洗脱缓冲液：20mM磷酸钠，0.5M 氯化钠，0.5mM咪唑，pH 7.4

注：动态结合能力取决于蛋白自身。

²室温时水

³剥离Ni²⁺的基质

剥离、重新装载Ni和清洁Ni Sepharose产品

剥离和重装载Ni

如果纯化同样的蛋白，每次纯化期间Ni Sepharose High Performance和Ni Sepharose 6 Fast Flow不需要剥离和重新装载。大概二到五次纯化之后进行剥离和重新装载已经足够，取决于特定的样品、样品的预处理和体积等。

剥离缓冲液：20mM 磷酸钠，500mM 氯化钠，50mM EDTA，pH 7.4

1. 用至少5到10倍柱体积的剥离缓冲液洗涤基质。
2. 用至少5到10倍柱体积的结合缓冲液洗涤。
3. 立即用5到10倍柱体积的蒸馏水洗涤。
4. 从柱子上方加入0.5倍柱体积的0.1M 硫酸镍重新装载被水洗过的柱子。
5. 用5倍柱体积的蒸馏水洗涤，再用5倍体积的结合缓冲液洗涤（调节pH）之后储存在20%的乙醇中。也可使用其它金属离子、氯化物或硫酸盐。



最后使用结合缓冲液洗涤使得在储存前获得正确的pH值非常重要。



使用金属离子溶液之前用缓冲液洗涤可能会引起不需要的沉淀。

清洁



当压力增大时就需要清洁基质。清洁之前应用上面介绍的方法先剥离金属离子，已剥离的基质可以用如下的方法清洁：

为去除离子结合蛋白：

1. 用数倍柱体积的1.5M 氯化钠洗涤。
2. 立即用大约10倍柱体积的蒸馏水洗涤。

为去除沉淀的蛋白、疏水结合的蛋白和脂蛋白：

1. 用1M 氢氧化钠洗涤柱子，接触时间通常为1-2小时（若去除内毒素则需12小时）。
2. 立即用大约10倍柱体积的结合缓冲液洗涤，之后用5-10倍柱体积的蒸馏水洗涤。

为去除疏水结合的蛋白、脂蛋白和脂类：

1. 用5-10倍柱体积的30%异丙醇洗涤约15-20分钟。
2. 立即用大约10倍柱体积的蒸馏水洗涤。
- 2a. 或者用溶解在碱性或酸性溶液中的2倍柱体积的去污剂洗涤。例如可以使用溶解在0.1M 醋酸中的0.1-0.5%的非离子型去污剂，接触时间1-2小时。处理之后通常在用至少5倍柱体积的70%乙醇洗涤以除去残留的去污剂，然后用大约10倍柱体积的蒸馏水洗涤。



反向流动可以提高清洁过程的效率。清洁之后将基质储存在20%的乙醇中（用5倍柱体积洗涤）或者在储存到乙醇中之前重新装载Ni²⁺。

未装载离子的IMAC Sepharose产品

推荐使用IMAC Sepharose High Performance 高分辨纯化，使用该产品能够得到尖峰和浓的洗脱蛋白。IMAC Sepharose 6 Fast Flow非常适合规模放大。

表38总结了IMAC Sepharose基质的主要特征，表39列出了这些基质在不同条件下的稳定性，表40和41总结了预装柱的基质特征，详细信息见第3章。

表38： IMAC Sepharose High Performance和IMAC Sepharose 6 Fast Flow的特征。

性质	IMAC Sepharose High Performance	IMAC Sepharose 6 Fast Flow
基质状	6%高度交联的琼脂糖	6%高度交联的琼脂糖
金属离子结合能力	大约每毫升柱材15 $\mu\text{mol Ni}^{2+}$	大约每毫升柱材15 $\mu\text{mol Ni}^{2+}$
平均颗粒大小	34 μm	90 μm
动态结合能力 ¹	每毫升柱材至少40mg 6组氨酸标签蛋白（装载了 Ni^{2+} 离子）	每毫升柱材至少40mg 6组氨酸标签蛋白（装载了 Ni^{2+} 离子） 无标签蛋白：大约每毫升柱材25mg（装载了 Cu^{2+} ）；大约每毫升柱材15mg（装载了 Zn^{2+} 或 Ni^{2+} ）
建议流速 ²	<150cm/h	150cm/h
使用过程中的兼容性	在所有通常使用的缓冲液、还原剂、变性剂和去垢剂中稳定。 更详细的信息见表39。	在所有通常使用的缓冲液、还原剂、变性剂和去垢剂中稳定。 更详细的信息见表39。
化学稳定性 ³	在40oC检测过1周：0.01M 盐酸, 0.1M 氢氧化钠。 检测过12小时：1M 氢氧化钠， 70% 乙酸。 检测过30分钟：30%异丙醇。 检测过1小时：2% SDS	在40oC检测过1周：0.01M 盐酸, 0.1M 氢氧化钠。 检测过12小时：1M 氢氧化钠， 70% 乙酸。 检测过30分钟：30%异丙醇。 检测过1小时：2% SDS
pH 稳定性 ³	短期（ ≤ 2 小时）： 2-14	短期（ ≤ 2 小时）： 2-14
	长期（ ≤ 1 周）： 3-12	长期（ ≤ 1 周）： 3-12
储存	20%乙醇	20%乙醇
储存温度	4-30°C	4-30°C

¹动态结合能力条件：

样 品：1mg/ml 结合缓冲液中带有6个组氨酸标签的纯蛋白（分子量43000）或从大肠杆菌裂解物中结合的6个组氨酸标签的蛋白（分子量28000）。载量是在有10%穿透时计算。

无标签蛋白（IMAC Sepharose 6 Fast Flow）：上样的蛋白是在结合缓冲液中1mg/ml人的 apotransferrin，载量是在有10%穿透时计算。

柱体积：0.25ml或1ml

流 速：分别是0.25ml/min或1ml/min

结合缓冲液：20mM磷酸钠，0.5M 氯化钠，5mM咪唑，pH 7.4

洗脱缓冲液：20mM磷酸钠，0.5M 氯化钠，0.5mM咪唑，pH 7.4

注：动态结合能力取决于蛋白自身。

²室温时水

³只对于未装载金属离子的介质。详细信息见表39。

表39：相容性指南：IMAC Sepharose High Performance和IMAC Sepharose 6 Fast Flow在这些成分中至少在指定的浓度下比较稳定。

化合物	浓度
还原剂 ¹	5mM DTE 5mM DTT 20mM β -巯基乙醇 5mM TCEP 10mM 还原型谷胱甘肽
变性剂	8M尿素 ² 6M盐酸胍 ²
去垢剂	2% Triton X-100（非离子） 2% Tween 20（非离子） 2% NP-40（非离子） 2% cholate（阴离子） 1% CHAPS（两性离子）
其它添加剂	20% 乙醇 50% 甘油 500mM 咪唑 100mM Na ₂ SO ₄ 1.5M 氯化钠 1mM EDTA ³ 60mM 柠檬酸 ²
缓冲液	50mM 磷酸钠pH7.4 100mM Tris-盐酸, pH7.4 100mM Tris-HAc,pH7.4 100mM HEPES, pH7.4 100mM MOPS,pH7.4 100mM 醋酸钠, pH4 ²

¹运行含有还原剂的样品/缓冲液之前应先空白运行去除还原剂的结合缓冲液和洗脱缓冲液，见第79页。

²在40 °C检测一周。

³1mM的强螯合剂EDTA曾在某些情况下成功使用，一般认为应谨慎使用螯合剂（并且只能用于样品而不能用在缓冲液中）。任何金属离子的剥离都可以通过在离心/过滤前往样品中加入稍微过量的氯化镁来中和。注意剥离的效果可能因样品体积的不同而有所差异。

表40: HiTrap IMAC HP和HiTrap IMAC FF的特征。

柱材	HiTrap IMAC HP: IMAC Sepharose High Performance HiTrap IMAC FF: IMAC Sepharose 6 Fast Flow
柱体积	1ml或5ml
动态结合能力 ¹	当装载了Ni ²⁺ 离子后，每毫升柱材至少40mg组氨酸标签蛋白。对于无标签蛋白，HiTrap FF当装载了Cu ²⁺ 离子，每毫升介质能结合25mg；当装载了Zn ²⁺ 或Cu ²⁺ 离子时，每毫升柱材大约能够结合15mg。
柱子大小	0.7×2.5cm（1ml）； 1.6×2.5cm(5ml)
建议流速	1ml/min（1ml）； 5ml/min（5ml）
最大流速 ²	4ml/min（1ml）； 20ml/min（5ml）
最大压力 ²	0.3MPa， 3bar
pH稳定性 ³	2-14（短期）， 3-12（长期）
兼容性	在所有通常使用的缓冲液、还原剂、变性剂和去垢剂中稳定。更详细的信息见表39。
化学稳定性 ³	在40°C检测过1周：0.01M 盐酸, 0.1M 氢氧化钠。 检测过12小时：1M 氢氧化钠， 70% 乙酸。 检测过30分钟：30%异丙醇。 检测过1小时：2% SDS
保存	20%乙醇
保存温度	4-30°C

¹动态结合能力条件：

样品：1mg/ml 结合缓冲液中带有6个组氨酸标签的纯蛋白（分子量43000）或从大肠杆菌裂解物中结合的6个组氨酸标签的蛋白（分子量28000）。载量是在有10%穿透时计算。无标签蛋白（IMAC Sepharose 6 Fast Flow）：上样的蛋白是在结合缓冲液中1mg/ml人的apotransferrin，载量是在有10%穿透时计算。

柱体积：0.25ml或1ml

流速：分别是0.25ml/min或1ml/min

结合缓冲液：20mM磷酸钠，0.5M 氯化钠，5mM咪唑（对于无标签蛋白和IMAC Sepharose 6 Fast Flow，使用1mM），pH 7.4

洗脱缓冲液：20mM磷酸钠，0.5M 氯化钠，0.5mM咪唑（对于无标签蛋白和IMAC Sepharose 6 Fast Flow，使用50mM），pH 7.4

注：动态结合能力取决于蛋白自身。

²室温时水

³只对于未装载金属离子的介质。详细信息见表39。

表41： HiPrep IMAC FF16/10的特征。

介质	IMAC Sepharose 6 Fast Flow
柱床体积	20ml
柱子大小	1.6 × 10cm
动态结合能力 ¹	当装载了Ni ²⁺ 离子后，每毫升柱材至少40mg组氨酸标签蛋白。 对于无标签蛋白， HiTrap FF当装载了Cu ²⁺ 离子，每毫升介质能结合25mg；当装载了Zn ²⁺ 或Cu ²⁺ 离子时，每毫升柱材大约能够结合15mg。
建议流速 ²	2-10ml/min（60-300cm/h）
最大流速 ²	10ml/min（300cm/h）
最大压力 ²	0.15Mpa， 1.5bar
柱管最大压力	0.5MPa， 5bar
使用过程中的兼容性	在所有通常使用的缓冲液、还原剂、变性剂和去垢剂中稳定。 更详细的信息见表39。
化学稳定性 ³	在40°C检测过1周： 0.01M 盐酸, 0.1M 氢氧化钠。 检测过12小时： 1M 氢氧化钠， 70% 乙酸。 检测过30分钟： 30%异丙醇。 检测过1小时： 2% SDS
储存	20%乙醇
储存温度	4-30°C

¹动态结合能力条件：

样 品：1mg/ml 结合缓冲液中带有6个组氨酸标签的纯蛋白（分子量43000）或从大肠杆菌裂解物中结合的6个组氨酸标签的蛋白（分子量28000）。载量是在有10%穿透时计算。无标签蛋白（IMAC Sepharose 6 Fast Flow）：上样的蛋白是在结合缓冲液中1mg/ml人的apotransferrin，载量是在有10%穿透时计算。

柱体积：0.25ml或1ml

流速：分别是0.25ml/min或1ml/min

结合缓冲液：20mM磷酸钠，0.5M 氯化钠，5mM咪唑（对于无标签蛋白和IMAC Sepharose 6 Fast Flow，使用1mM），pH 7.4

洗脱缓冲液：20mM磷酸钠，0.5M 氯化钠，0.5mM咪唑（对于无标签蛋白和IMAC Sepharose 6 Fast Flow，使用50mM），pH 7.4

注：动态结合能力取决于蛋白自身。

²室温时水

³只对于未装载金属离子的介质。详细信息见表39。

剥离、重新装载和清洁IMAC Sepharose产品

如果纯化同样的蛋白，每次纯化期间IMAC Sepharose High Performance和IMAC Sepharose 6 Fast Flow不需要剥离和重新装载。大概二到五次纯化之后进行剥离和重新装载已经足够，取决于特定的样品、样品的预处理和体积等。

剥离和重新装载

剥离缓冲液：20mM 磷酸钠，500mM 氯化钠，50mM EDTA，pH 7.4

1. 用至少5到10倍柱体积的剥离缓冲液洗涤基质。
2. 用至少5到10倍柱体积的结合缓冲液洗涤。
3. 立即用5到10倍柱体积的蒸馏水洗涤。
4. 使用蒸馏水配制0.1M选定的金属离子溶液，可以使用盐酸盐或硫酸盐等，如0.1M 硫酸铜或0.1M硫酸镍。
5. 加入至少0.5倍柱体积的0.1M 金属离子/盐溶液重新装载被水洗过的柱子。
6. 用5倍柱体积的蒸馏水洗涤，再用5倍体积的结合缓冲液洗涤（调节pH）之后储存在20%的乙醇中。



最后使用结合缓冲液洗涤使得在储存前获得正确的pH非常重要。



使用金属离子溶液之前用缓冲液洗涤可能会引起不需要的沉淀。

清洁



当压力增大时就需要清洁基质。清洁之前应用上面介绍的方法先剥离金属离子，已剥离的基质可以用如下的方法清洁：

为去除离子结合蛋白：

1. 用数倍柱体积的1.5-2.0M 氯化钠洗涤。
2. 立即用3-10倍柱体积的蒸馏水洗涤。

为去除沉淀的蛋白、疏水结合的蛋白和脂蛋白：

1. 用1M NaOH洗涤柱子，接触时间通常为1-2小时（若去除内毒素则需12小时以上）。
2. 立即用大约10倍柱体积的结合缓冲液洗涤，之后用5-10倍柱体积的蒸馏水洗涤。

为去除疏水结合的蛋白、脂蛋白和脂类：

1. 用5-10倍柱体积的30%异丙醇洗涤约15-20分钟。
2. 立即用大约10倍柱体积的蒸馏水洗涤。
- 2a. 或者用溶解在碱性或酸性溶液中的2倍柱体积的去污剂洗涤。例如可以使用溶解在0.1M 醋酸中的0.1-0.5%的非离子型去污剂，接触时间1-2小时。处理之后通常在用至少5倍柱体积的70%乙醇洗涤以除去残留的去污剂，然后用大约10倍柱体积的蒸馏水洗涤。



反向流动可以提高清洁过程的效率。清洁之后将基质储存在20%的乙醇中（用5倍柱体积洗涤）或者在储存到乙醇中之前重新装载金属离子。

附录2 Glutathione Sepharose产品的特征

推荐使用Glutathione Sepharose High Performance 高分辨纯化GST标签蛋白，使用该产品能够得到尖峰和浓的洗脱蛋白。Glutathione Sepharose Fast Flow非常适合规模放大，Glutathione Sepharose 4B适合组装较小的和包括批量纯化在内的其它形式的柱子。

表42总结了这三种Glutathione Sepharose基质的主要特征，表43列出了这些基质在不同条件下对不同成分的稳定性，表44到45总结了同种基质预装为GSTrap HP，GSTrap FF，GSTrap 4B柱子和96孔板的特征。详细信息见第5章。

表42： Glutathione Sepharose High Performance、Glutathione Sepharose 4 Fast Flow和Glutathione Sepharose 4B的特征。

性质	Glutathione Sepharose High Performance	Glutathione Sepharose 4 Fast Flow	Glutathione Sepharose 4B
基质	6%高度交联的琼脂糖	4%高度交联的琼脂糖	4%琼脂糖
平均颗粒体积	34 μ m	90 μ m	90 μ m
配体浓度	每毫升柱材（基于Gly）1.5-3.5mg谷胱甘肽	每毫升柱材120-320 μ mol谷胱甘肽	每克洗过的干柱材200-400 μ mol谷胱甘肽
结合能力 ¹	每毫升柱材>10mg 重组GST	每毫升柱材>10mg 重组GST	每毫升柱材>5mg 重组GST
建议流速 ²	<150cm/h	50-300cm/h	<75cm/h
化学稳定性	对所有通常使用的液态缓冲液稳定。比如1M醋酸，pH4.0和6M盐酸胍，在室温1小时。	对所有通常使用的液态缓冲液稳定。比如1M醋酸，pH4.0和6M盐酸胍，在室温1小时。	对所有通常使用的液态缓冲液稳定。室温暴露于0.1M 氢氧化钠，70%乙醇或6M盐酸胍2小时，或1%（w/v）SDS 14天都不会显著的导致活力降低。
pH稳定性	3-12	3-12	4-13
储存温度	4-30°C	4-30°C	4-8°C
储存缓冲液	20%乙醇	20%乙醇	20%乙醇

¹ 上样样品中GST标签蛋白的结合依赖于其大小，构象和浓度。GST和谷胱甘肽的结合也是流速依赖的。低流速通常增加结合能力。这在样品上样时很重要。蛋白的性质，pH和温度以及使用的介质都会影响结合能力。

² 室温时水。

表43： GST MultiTrap FF和GST MultiTrap 4B的特征。

介质	GST MultiTrap FF: Glutathione Sepharose 4 Fast Flow GST MultiTrap 4B: Glutathione Sepharose 4B
过滤板大小1	127.8×85.5×30.6mm
过滤板材料	聚丙烯和聚乙烯
结合能力	GST MultiTrap FF: 每孔最多0.5mg GST 标签蛋白。 GST MultiTrap 4B: 每孔最多0.5mg GST 标签蛋白。
孔间可重复性	+/-10%
每孔装载体积	50 μl (500 μl 10%的悬浊液)
孔数	96
离心速度:	依赖于样品预处理和样品性质
建议	100-500×g
最大	700×g
真空压力:	依赖于样品预处理和样品性质
建议	-0.1到-0.3bar
最大	-0.5bar
pH稳定性	Glutathione Sepharose 4 Fast Flow: 3-12 Glutathione Sepharose 4B: 4-13
储存	20% 乙醇
储存温度	4-8°C

¹根据ANSI/SBS1-2004，3-2004和4-2004标准（ANSI为美国国家标准，SBS为生物分子筛选协会）。

²每孔洗脱的目蛋白的量和整块板子每孔平均洗脱量相比相差不多于+/-10%.

表44：预装GSTrap HP、GSTrap FF和GSTrap 4B柱子的特征。

性质	GSTrap HP	GSTrap FF	GSTrap 4B
介质	Glutathione Sepharose High Performance	Glutathione Sepharose 4 Fast Flow	Glutathione Sepharose 4B
平均颗粒体积	34 μ m	90 μ m	90 μ m
动态结合能力 ¹²	每毫升柱材大约10mg 重组GST标签蛋白，分子量63000	每毫升柱材大约11mg 重组GST标签蛋白，分子量43000	每毫升柱材大约10mg 重组GST，分子量26000
最大柱压 ³	0.3MPa，3bar	0.3MPa，3bar	0.3MPa，3bar
建议流速 ²	样品上样： 0.2-1ml/min(1ml)和1-5ml/min(5ml) 洗涤和洗脱： 1-2ml/min(1ml)和5-10ml/min(5ml)	样品上样： 0.2-1ml/min(1ml)和1-5ml/min(5ml) 洗涤和洗脱： 1-2ml/min(1ml)和5-10ml/min(5ml)	样品上样： 0.2-1ml/min(1ml)和1-5ml/min(5ml) 洗涤和洗脱： 1-2ml/min(1ml)和5-10ml/min(5ml)
化学稳定性	对所有通常使用的液态缓冲液稳定。比如1M醋酸，pH4.0和6M盐酸胍，在室温1小时。	对所有通常使用的液态缓冲液稳定。比如1M醋酸，pH4.0和6M盐酸胍，在室温1小时。	对所有通常使用的液态缓冲液稳定。室温暴露于0.1M 氢氧化钠，70%乙醇或6M盐酸胍2小时，或1% (w/v) SDS 14天都不会显著的导致活力降低。
pH稳定性	3-12	3-12	4-13
储存温度	4-30°C	4-30°C	4-8°C
储存缓冲液	20%乙醇	20%乙醇	20%乙醇

以上三种GSTrap柱子的尺寸相同（1ml柱子为0.7×2.5cm，5ml柱子为1.6×2.5cm），柱体积为1ml和5ml。

¹GST标签蛋白与基质的结合取决于上样品蛋白的大小、构象和浓度。GST与谷胱甘肽的结合也取决于流速，低流速能够增加结合能力，在上样时非常重要。蛋白的特征、pH值和温度以及使用的基质都能影响结合能力。

²动力结合能力条件（60%穿透）：

样品：溶在结合缓冲液中1mg/ml纯的GST标签蛋白

柱体积：0.4ml

流速：0.2ml/min（60cm/h）

结合缓冲液：10mM磷酸钠，140mM 氯化钠，2.7mM KCl，pH7.4

洗脱缓冲液：50mM Tris-盐酸，10mM还原型谷胱甘肽，pH8.0

³室温时水。

表45：GSTPrep FF 16/10的特征。

性质	GSTPrep FF 16/10
介质	Glutathione Sepharose 4 Fast Flow
柱体积	20ml
柱子尺寸	1.6×10cm
动态结合能力 ¹²	每毫升柱材大约11mg 重组GST标签蛋白，分子量43000
建议流速 ³	1-10ml/min（30-300cm/h）
最大流速 ³	10ml/min（300cm/h）
操作过程中最大柱压 ³	1.5bar（0.15MPa，22psi）
柱管最大限压	5bar（0.5Mpa，73psi）
储存	2-%乙醇
储存温度	4-30℃

¹GST标签蛋白与基质的结合取决于上样品蛋白的大小、构象和浓度。GST与谷胱甘肽的结合也取决于流速，低流速能够增加结合能力，在上样时非常重要。蛋白的特征、pH值和温度以及使用的基质都能影响结合能力。

²动力结合能力条件（60%穿透）：

样品：溶在结合缓冲液中1mg/ml纯的GST标签蛋白

柱体积：0.4ml

流速：0.2ml/min（60cm/h）

结合缓冲液：10mM磷酸钠，140mM 氯化钠，2.7mM KCl，pH7.4

洗脱缓冲液：50mM Tris-盐酸，10mM还原型谷胱甘肽，pH8.0

³室温时水。

清洁Glutathione Sepharose产品

以下步骤适用于大量基质和预装柱。

 纯化柱和纯化基质的重新使用取决于样品的性质，为避免交叉污染只有样品完全相同时才能再次使用。

需要时Glutathione Sepharose High Performance、Glutathione Sepharose 4 Fast Flow和Glutathione Sepharose 4B基质和预装柱能够通过以下方法再生：

1. 用2-3倍柱体积的高pH（0.1M Tris-HCl，0.5M 氯化钠，pH8.5）和低pH（0.1M醋酸钠，0.5M 氯化钠，pH4.5）的缓冲液交替洗涤。
2. 重复循环3次。
3. 用3-5倍柱体积pH7.3的PBS再平衡。

如果Glutathione Sepharose失去结合能力，可能由于逐渐积累的沉淀、变性或非特异结合的蛋白所致。

为去除沉淀或变性的物质：

1. 用2倍柱体积6M 的盐酸胍洗涤。
2. 立即用5倍柱体积pH7.3的PBS洗涤。

为去除疏水结合的物质：

1. 用3-4倍柱体积70%的乙醇（或2倍柱体积1%的Triton X-100）洗涤。
2. 立即用5倍柱体积pH7.3的PBS洗涤。

为长期保存（超过1个月）：

1. 用5-10倍柱体积pH7.3的PBS洗两遍。
2. 用20%的乙醇再次洗涤。
3. 储存在4-8 ° C。
4. 使用前用5-10倍柱体积pH7.3的PBS再平衡。

附录3 沉淀和重新溶解

如果已知粗样品中含有脂类、脂蛋白或酚红等可能结合柱子的污染物或一些显著的杂质如大量蛋白等，则需要特殊的步骤将它们在层析之前除去。

分级沉淀

分级沉淀通常用于实验室规模的从少量体积样品中去除大量杂质和较小规模的商业生产。例如，在实验室规模使用HisTrap或GSTrap等HiTrap亲和和纯化柱时需要分级沉淀。

沉淀的方法是根据不同组分的溶解度不同从而进行分离。例如，由于不同蛋白样品的疏水程度不同，提高盐浓度能够增强蛋白之间的疏水作用而导致沉淀。分级沉淀能够在三种不同方式下去除大量杂质，如图95所示。

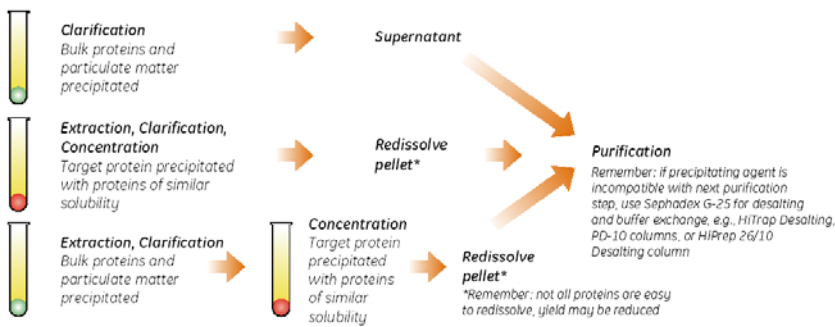


图95：使用沉淀的三种方式。

 沉淀技术受温度、pH值和样品浓度的影响，必须控制这些参数以保证实验结果的可重复性。

 多数沉淀技术不适用于大规模制备。

沉淀剂举例见表46，稍后详细介绍了最常用的硫酸铵沉淀方法。

表46：沉淀技术举例。

沉淀剂	典型使用的沉淀条件	样品类型	评论
硫酸铵	描述见下	>1mg/ml蛋白，尤其是免疫球蛋白	稳定蛋白，没有变性，上清可以直接用于HIC，可以有助于减少脂含量。
硫酸葡聚糖	每毫升样品加入0.04ml 10% 硫酸葡聚糖和1ml 1M 氯化钙,混合15分钟，10000×g离心，弃去沉淀。	样品具有高水平的脂蛋白，比如腹水	沉淀脂蛋白
聚乙烯基吡咯烷酮	加入3%（w/v），搅拌4h，17000×g离心，弃去沉淀。	样品具有高水平的脂蛋白，比如腹水	硫酸葡聚糖的替代方法。
聚乙二醇（PEG，分子量高于4000）	最多20%（w/v）	细胞浆蛋白	无变性，上清直接上样到离子交换层析或亲和层析。完全除去可能会比较困难。稳定蛋白。
丙酮（冷）	最多80%（v/v）在0oC。全速离心后在EP管中收集沉淀，		可能不可逆地变性蛋白。对于沉淀肽和浓缩样品电泳有用。
聚乙烯亚胺	0.1%（w/v）		沉淀聚集的核蛋白。
硫酸鱼精蛋白	1%（w/v）		沉淀聚集的核蛋白。
硫酸链霉素	1%（w/v）		沉淀核酸
正辛酸	(X/15) g X=样品体积	抗体浓度应该大于1mg/ml	从血清或腹水中沉淀大部分蛋白。把免疫球蛋白留在溶液中。

细节从此处摘录：Scopes R.K.著，《蛋白纯化，原理与实践》，Springer出版社，1994年出版。
J.C. Janson 和L. Rydén,著，《蛋白纯化，原理，高分辨方法和应用，第二版》Wiley Inc出版社，1998年出版。

硫酸铵沉淀

硫酸铵沉淀广泛应用在起始样品的浓缩和清理。随着盐浓度的提高，蛋白开始盐析，不同蛋白在不同盐浓度下盐析，因此这一过程非常适合从粗提取物中去除杂质蛋白。需要优化盐浓度使目的蛋白不能析出而杂蛋白能够析出，另外需要进一步提高盐浓度使目的蛋白沉淀。如果目的蛋白不能被安全沉淀和重新溶解，则只需进行第一步。疏水作用层析通常是比较合适的选择，因为样品已经含有高浓度的盐成分并能够几乎不用处理直接用于疏水作用层析柱，升高的盐成分能够增加样品疏水区与层析基质之间的作用。

沉淀所需溶液：

饱和硫酸铵溶液（100克硫酸铵加至100ml蒸馏水中，搅拌溶解）

1M Tris-HCl, pH8.0

第一步纯化所需的溶液。



有些蛋白可能会被硫酸铵破坏。加入固体硫酸铵时应小心，局部浓度过高可能会导致不需要的蛋白沉淀。



初始硫酸铵沉淀之后可在第二步使用疏水作用层析。



对于日常可重复的纯化步骤，可用层析法而不进行硫酸铵沉淀。



通常沉淀法对于浓度低于1mg/ml的蛋白几乎无效。

1. 过滤（0.45 μ m）或离心（4° C，10000g）样品。
2. 加入样品体积1/10的1M pH8.0的Tris-HCl以维持pH值。
3. 温和搅拌，逐滴加入硫酸铵溶液至50%饱和，搅拌1小时。
4. 10000×g离心20分钟。
5. 去除上清，用等体积相同浓度（例如，一种不能使沉淀蛋白重新溶解的溶液或能够引起进一步沉淀的溶液）的硫酸铵溶液重悬并洗涤沉淀两次，再次离心。
6. 用较少体积的下一步所需溶液溶解沉淀。
7. 硫酸铵可使用脱盐柱通过Sephadex G-25净化/更换缓冲液而去除（见第9章）。达到特定饱和度所需硫酸铵的量随温度不同而不同，表47给出了20° C时的用量。

表47：在20° C，达到给定饱和度所需加入硫酸铵的量。

	所要达到的最终饱和度																		
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100		
起 始 饱 和 度	20° C时每升溶液所需加入的硫酸铵的量（克）t																		
0	113	144	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761		
5	85	115	146	179	212	246	282	319	358	397	439	481	526	572	621	671	723		
10	57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685		
15	28	58	88	119	151	185	219	255	293	331	371	413	456	501	548	596	647		
20	0	29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609		
25		0	29	60	91	123	157	191	228	265	304	344	386	429	475	522	571		
30			0	30	61	92	125	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533		
35				0	30	62	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495		
40					0	31	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457		
45						0	31	64	98	132	169	206	245	286	329	373	419		
50							0	32	65	99	135	172	210	250	292	335	381		
55								0	33	66	101	138	175	215	256	298	343		
60									0	33	67	103	140	179	219	261	305		
65										0	34	69	105	143	183	224	267		
70											0	34	70	107	146	186	228		
75												0	35	72	110	149	190		
80													0	36	73	112	152		
85														0	37	75	114		
90															0	37	76		
95																0	38		

附录4 填充和制备柱子

GE Healthcare提供的预装柱能够保证高效、可重复的结果。

 使用预装柱或96孔过滤板筛选基质和优化方法能够提高开发方法的效率。

有效填充柱子对于达到较好的分离效果尤其在使用梯度洗脱时非常重要，未能填充好的柱子将会导致不均衡的流速、峰宽和分辨率的降低。如果需要填充柱子，下述指导适用于所有规模的操作：

- 当需要使用结合技术时，使用短而粗的柱子（通常柱床高度为5到15厘米）用于快速纯化，即使线形流速低。
- 所需的基质取决于基质的结合能力和样品量。基质的结合能力通常受基质本身和样品疏水性的影响，因此必须凭经验确定。首先估计结合目标样品所需的基质质量，使用五倍的量填充柱子。如果分辨率符合要求则可减少所用的基质质量。
- 一旦确定了分离常数，可以通过增加柱子的直径以增大其体积将纯化体系放大，而不能增加柱子的高度因为这样会改变分离条件。

标签蛋白所需的亲和基质可以填充在GE Healthcare提供的Tricorn或XK柱子中，逐步填充的示范见以CD形式提供的“柱子填充影片”（见订购信息）。



图96：“装柱教学影片”提供一步一步的装柱示例。

1. 分离时将所有材料平衡至所需的温度。

2. 用所需溶液冲洗柱子底端以赶除气泡，确定柱网下没有气泡。关掉柱子出口，在柱管中留下1到2厘米的缓冲液。
3. 温和重悬基质。

注意GE Healthcare提供的亲和基质可以直接使用，不需要为防止柱子堵塞而除去微小杂质。

禁止使用磁珠以免破坏介质。



4. 根据建议，估计需要的悬浊液（重悬的基质）总量。
5. 加入所需体积的混合物至柱子中，使用玻璃棒引流可以避免出现气泡。
6. 立即将缓冲液装满柱子。
7. 装入柱子顶部部件，并将柱子连接到泵上。
8. 打开柱子出口，设定泵的流速（例如XK 16/20柱流速为15ml/min）。

若混合物体积大于柱体积，则应另外连接一个储存用的玻璃柱（详见订购信息）。这样使得混合物在填充时的直径维持恒定，从而减少紊流并提高柱子的填充状态。



如果不能达到所需的流速，则使用泵能承受的最大流速。



不要超过基质或柱子的最大操作压力。



9. 达到柱床高度后继续维持至少3倍柱体积的填充流速，在柱子上标记柱床高度。

在任何纯化过程中的流速都不能超过填充流速的75%。



10. 关闭泵和柱子出口，移除上盖加入缓冲液充满柱子使之产生向上的凸面。
11. 将接头以一定角度插入柱子中，确保在网下无气泡。
12. 将接头沿柱子向下滑行（打开接头的出口）直到标记的位置，锁上接头。
13. 将柱子与泵连接开始平衡柱子，可根据需要改变接头的位置。

基质必须彻底清洗以除去贮存液（通常为20%的乙醇），少量的乙醇会影响后续的实验。



使用含抗微生物剂的无菌PBS缓冲液平衡的柱子可以在4°C保存一个月以上，但通常需要按照产品要求的特殊方法保存柱子。



选择柱子

Tricorn和XK柱完全符合现代基质所能达到的高流速要求，且有较宽范围的尺寸可供选择（见表48）。多数情况下所需的柱子大小由基质的结合能力和需要纯化的样品量决定，对于使用重力流的单次纯化可用一次性使用的空PD-10柱。所有柱子的列表信息参考GE Healthcare的目录、Biodirectory或www.gehealthcare.com/protein-purification。

表48：柱床体积和高度。

	柱子大小		柱床体积（ml）	柱床高度（cm）
	直径（mm）	长度		
Tricorn5/20	5	20mm	0.31-0.55	1.6-2.8
Tricorn5/50	5	50mm	0.90-1.14	4.6-5.8
Tricorn10/20	10	20mm	1.26-2.20	1.6-2.8
Tricorn10/50	10	50mm	3.61-4.56	4.6-5.8
Tricorn10/100	10	100mm	7.54-8.48	9.6-10.8
XK 16/20	16	20cm	5-31	2.5-15
XK 16/40	16	40cm	45-70	22.5-35
XK 26/20	26	18cm	5.3-66	1-12.5
XK 26/40	26	40cm	122-186	23-35
XK 50/20	50	18cm	0-274	0-14
XK 50/30	50	30cm	265-559	13.5-28.5
空的可丢弃的PD-102	15	7.4cm	8.3	4.8-5

- 1 当使用适配器时，可以适用于所有的Tricorn或XK柱子的规格。
- 2 用于重力流应用。和LabMate 缓冲液池一同使用，可以上样至多25ml样品或缓冲液，这样可以显著的节省处理时间。

附录5 换算数据：蛋白、柱压

质量 (g/mol)	1 μ g	1nmol
10000	100pmol; 6×10 ¹³ 个分子	10 μ g
50000	20pmol; 1.2×10 ¹³ 个分子	50 μ g
100000	10pmol; 6.0×10 ¹² 个分子	100 μ g
150000	6.7pmol; 4.0×10 ¹² 个分子	150 μ g

蛋白	1mg/ml的A280
IgG	1.35
IgM	1.20
IgA	1.30
蛋白A	0.17
亲和素	1.50
链霉亲和素	3.40
牛血清白蛋白	0.70

1kb DNA =333个编码氨基酸
=37000g/mol

270bp DNA=10000g/mol

1.35kb DNA=50000g/mol

2.70kb DNA=100000g/mol

一个氨基酸的平均分子量=120g/mol

柱压

最大操作压力指超过该压力柱溶物可能会被压缩。

压力单位可以用MPa、bar或psi表示，它们之间换算如下：1MPa=10bar=145psi

附录6 直线流速（cm/h）和体积流速（ml/min）之间的相互转换

在比较不同尺寸柱子的结果时使用直线速度（cm/h）十分方便，但是流速通常用体积流速（ml/min）计算，可用下面的公式进行直线速度和体积流速的换算。

从直线速度（cm/h）到体积流速（ml/min）

$$\text{体积流速 (ml/min)} = \frac{\text{直线速度 (cm/h)}}{60} \times \text{柱子横截面积 (cm}^2\text{)}$$

$$= \frac{Y}{60} \times \frac{\pi \times d^2}{4}$$

其中Y=直线速度（cm/h） d=柱子内径（cm）

例如：

XK 16/70柱子（内径为1.6cm）直线速度为150cm/h时的体积流速是多少？

Y=直线速度=150cm/h d=柱子内径=1.6cm

$$\text{则体积流速 (ml/min)} = \frac{150 \times \pi \times 1.6 \times 1.6}{60 \times 4} \text{ ml/min} = 5.03 \text{ ml/min}$$

从体积流速（ml/min）到直线速度（cm/h）

$$\text{直线速度 (cm/h)} = \frac{\text{体积流速 (ml/min)} \times 60}{\text{柱子横截面积 (cm}^2\text{)}} = Z \times 60 \times \frac{4}{\pi \times d^2}$$

其中

Z=体积流速（ml/min） d=柱子内径（cm）

例如：

Tricorn 5/50柱子（内径0.5cm）的体积流速为1ml/min时的直线速度是多少？

Z=体积流速=1ml/min d=柱子内径=0.5cm

$$\text{直线速度} = 1 \times 60 \times \frac{4}{\pi \times 0.5 \times 0.5} \text{ cm/h} = 305.6 \text{ cm/h}$$

从ml/min到使用注射器

1ml/min=HiTrap 1ml柱子约30滴/分钟

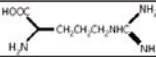
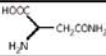
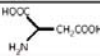
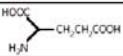
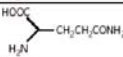
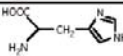
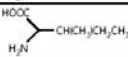
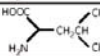
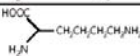
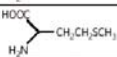
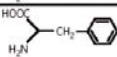
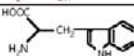
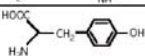
5ml/min=HiTrap 5ml柱子约120滴/分钟



pGEX系列载体的比较区域

SELECTION GUIDE – pGEX Vector Control Regions									
pGEX-2TK		pGEX-4T-1		pGEX-4T-2		pGEX-4T-3		pGEX-5K-1	
27-4587-01		27-4580-01		27-4581-01		27-4583-01		27-4584-01	
Glutathione S- Transferase Region									
lac promoter									
-10		205-211		205-211		205-211		205-211	
-35		183-188		183-188		183-188		183-188	
lac operator									
Ribosome binding site for GST		217-237		217-237		217-237		217-237	
Start codon (ATG) for GST		258		258		258		258	
Coding region for thrombin cleavage									
Coding region for Factor Xa cleavage		918-935		918-935		NA		NA	
Coding region for PreScission									
Protease cleavage		NA		NA		NA		918-938	
Coding for kinase recognition site									
Multiple Cloning Site		930-966		930-967		930-965		934-969	
β-lactamase (Amp ^r) Gene Region									
Promoter		1330-1335		1331-1336		1329-1334		1333-1338	
-10		1307-1312		1308-1313		1306-1311		1310-1315	
-35		1377		1378		1376		1380	
Start codon (ATG)									
Start codon (TAI)		2235		2236		2234		2238	
LacZ ⁺ Gene Region									
Start codon (ATG)		3318		3319		3317		3321	
Start codon (TCA)		4398		4399		4397		4401	
Plasmid Replication Region									
Site of replication initiation		2995		2996		2994		2998	
Region necessary for replication									
Sequencing Primers		2302-2998		2303-2999		2301-2997		2305-3001	
5' pGEX Sequencing									
Primer binding		869-891		869-891		869-891		869-891	
3' pGEX Sequencing									
Primer binding		1041-1019		1042-1020		1040-1018		1044-1022	
GenBank Accession Number									
Complete DNA sequences and restriction site data are available with each individual vector's product information, at the GE Healthcare Web site www.genehealthcare.com/life/sciences/ .		U13851		U13854		U13855		U13857	
		869-891		1046-1024		1056-1035		1057-1035	
		U13872		U13873		U13874		U13875	

附录8 氨基酸表

Amino acid	Three-letter code	Single-letter code	Structure
Alanine	Ala	A	
Arginine	Arg	R	
Asparagine	Asn	N	
Aspartic Acid	Asp	D	
Cysteine	Cys	C	
Glutamic Acid	Glu	E	
Glutamine	Gln	Q	
Glycine	Gly	G	
Histidine	His	H	
Isoleucine	Ile	I	
Leucine	Leu	L	
Lysine	Lys	K	
Methionine	Met	M	
Phenylalanine	Phe	F	
Proline	Pro	P	
Serine	Ser	S	
Threonine	Thr	T	
Tryptophan	Trp	W	
Tyrosine	Tyr	Y	
Valine	Val	V	

附录9 不同纯化技术的原理和标准条件

亲和层析

亲和层析通过蛋白与交连在亲和基质上特定配体之间可逆的作用分离蛋白，该技术非常适合用于捕获或中间纯化步骤并且只要目的蛋白存在合适的配体就能够使用。亲和层析具有高选择性高因而高分辨率，并且对目的蛋白通常具有较强的结合能力。亲和层析通常用在两步纯化的第一步（捕获步骤）使用，之后再通过另外的层析步骤（精细纯化步骤）进一步去除杂质。

目的蛋白能够特异地与其互补结合物（配体）可逆结合，样品处在利于结合配体的条件下，未能结合的物质被清洗去除，最后改变成利于解离的条件，将目的蛋白回收。解离可以特异地通过加入竞争性配体完成，也可非特异地通过改变pH值、离子强度或极性条件而实现。在结合的过程中目的蛋白逐渐浓缩并最终纯化浓缩的形式被收集。亲和层析分离的主要步骤见图98，亲和层析也可用于除去特定的杂质，如Benzamidine Sepharose 4 Fast Flow能够去除丝氨酸蛋白酶。

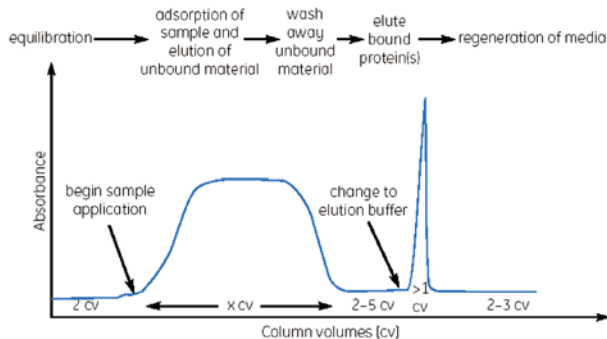


图98：典型的亲和纯化过程。

进一步信息

《蛋白纯化手册》（货号：18-1132-29）

《亲和层析手册：原理和方法》（货号：18-1022-29）

本手册的第3章和第5章，分别介绍了组氨酸和GST标签蛋白的纯化。

离子交换层析

离子交换层析通过表面电荷的不同分离蛋白，能够在高样品载量下进行非常高分辨率的分离。这一分离基于带电荷的蛋白与相反电荷的基质之间可逆的相互作用，蛋白在上样到柱子上时与之结合。通过改变不同的条件使不同的物质能够分别被洗脱下来，洗脱通常在提高盐浓度或改变pH值的条件下进行，这些条件通常逐步变化或具有连续的梯度。最常用的情况是样品被盐（氯化钠）梯度洗脱（图99）。在结合的过程中目的蛋白逐渐浓缩并最终纯化浓缩的形式被收集。

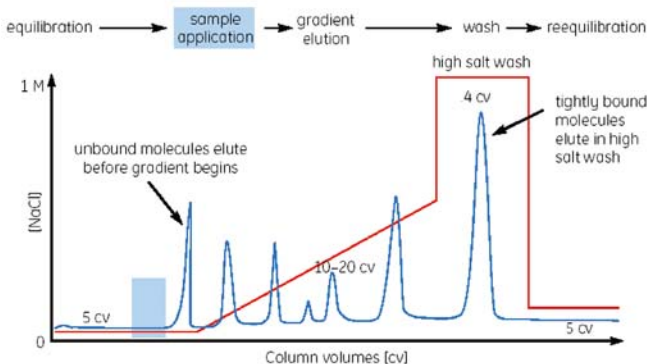


图99：典型的离子交换层析洗脱。

蛋白的表面净电荷随周围环境pH值的变化而改变。通常认为蛋白在高于其等电点的pH值时与阴离子交换剂结合，而在低于其等电点时与阳离子交换剂结合。值得注意的是这种结合是电荷依赖性的，即使在等电点的另一侧表面电荷也可能足够产生结合。通常离子交换层析用于结合目标分子，但需要时同样可用于结合杂质。为分离带有不同电性的多种蛋白，离子交换层析可以在不同pH值时重复使用，见图100。

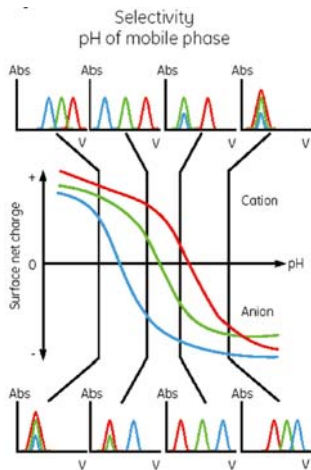


图100：pH值对蛋白洗脱样式的影响。

方法的建立（先后顺序排列）

1. 选择合适的离子交换剂，为节省时间和样品选用小柱子，如HiTrap IEX Selection Kit。
2. 寻找最佳pH值使结合能力和分辨率达到最高。从距离目的蛋白等电点（如果知道的话）0.5-1个pH单位开始。

3. 选用最陡的梯度使得在选定的pH值上获得可接受的分辨效果。
4. 选用维持该分辨率的最高流速和最短分离时间，检查特定基质的推荐流速。

 为节省分离时间，减少溶液消耗，可以在优化方法后分步洗脱（如图101所示），使用分步洗脱能增加蛋白上样量。

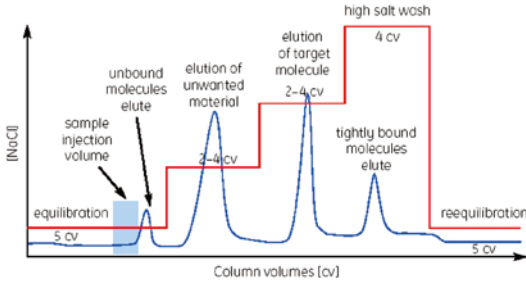


图101：逐步洗脱。

进一步信息

《蛋白纯化手册》（货号：18-1132-29）

《离子交换层析和层析聚焦手册：原理和方法》（货号：11-0004-21）

疏水作用层析

疏水作用层析根据蛋白疏水性的不同分离蛋白，该技术非常适合用于捕获或中间步骤的纯化过程。这一分离方法基于蛋白与层析基质的疏水表面之间的可逆的相互作用，高离子强度的缓冲液能够增强这种相互作用，因此疏水作用层析最适合用于硫酸铵沉淀或离子交换层析中高盐洗脱之后的下一步纯化过程。高离子强度溶液（如1.5M硫酸铵）中的样品在上样到柱子上时即开始与之结合，通过改变条件使结合的物质分别被洗脱下来。

洗脱通常在盐浓度降低时进行（图102）。盐浓度通常被逐步改变或连续梯度降低，样品通常在逐渐降低的硫酸铵梯度中被洗脱下来。在结合的过程中目的蛋白逐渐浓缩并最终纯化浓缩的形式被收集。其它一些洗脱过程包括降低洗脱物的极性（高达50%的乙二醇梯度）、加入离液剂（尿素、盐酸胍）或去污剂、改变pH值或温度等。

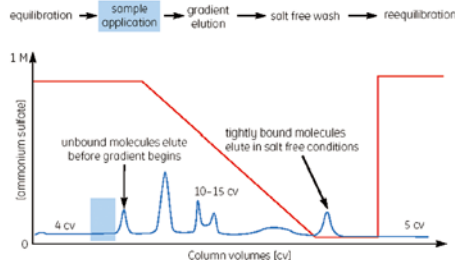


图102：典型的疏水作用层析梯度洗脱。

方法的建立（先后顺序排列）

1. 蛋白的疏水行为比较难预测，必须慎重考虑结合条件，可使用HiTrap 疏水作用层析选择试剂盒或RESOURCE 疏水作用层析检测试剂盒筛选所需盐浓度范围内的最佳结合基质和洗脱条件。对于疏水特征未知的蛋白从0-100%B（0%B，如1M硫酸铵）开始，蛋白在结合缓冲液中的溶解度信息非常重要，因为高浓度的盐（如硫酸铵）可能会导致蛋白沉淀。
2. 选择分辨率可以接受的梯度。
3. 选用维持该分辨率的最高流速和最短分离时间，检查特定基质的推荐流速。
4. 如果样品与基质的结合能力特别强，则可以改变引起构型变化的条件如pH值、温度、离液离子或有机溶剂等。可以通过筛选确定这些试剂的作用，或者更换成疏水性较弱的基质。

 为节省分离时间，减少溶液消耗，可以在优化方法后分步洗脱（如图103所示），使用分步洗脱能增加蛋白上样量。

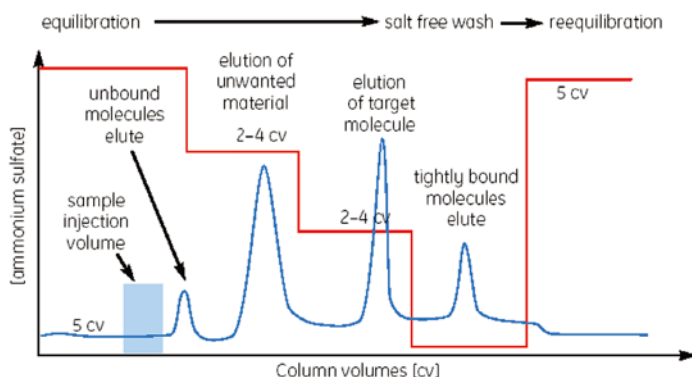


图103：逐步洗脱。

进一步信息

《蛋白纯化手册》（货号：18-1132-29）

《疏水作用层析和反相层析手册：原理和方法》（货号11-0012-69）

凝胶过滤层析

凝胶过滤层析通过蛋白分子的大小进行分离，该技术非常适用于纯化过程中样品体积减少后（样品体积对凝胶过滤的速度和分辨率有重要影响）的最后精细纯化阶段。样品被均匀（单一溶液，无梯度，图104）洗脱。为适应样品类型或进一步纯化、分析或储存的需要可以改变溶液的条件，溶液的组成通常对分辨率影响不大。蛋白在选用的溶液中以纯化的形式被收集。

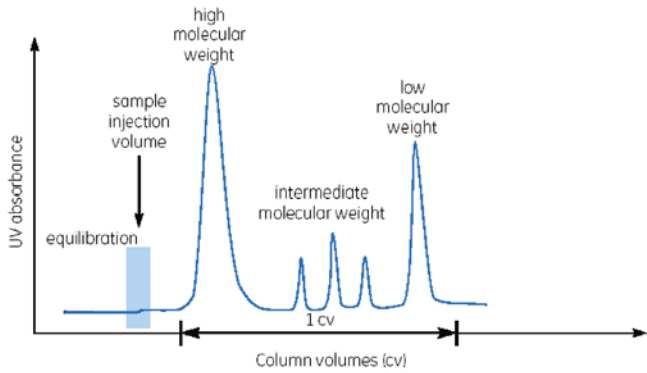


图104：典型的凝胶过滤洗脱。

进一步信息

《蛋白纯化手册》（货号18-1132-29）

《凝胶过滤手册：原理和方法》（货号18-1022-18）

反相色谱

反相色谱通过蛋白或多肽与层析基质的疏水表面之间可逆的相互作用所产生的疏水性的不同进行分离。样品在上样到柱子上时即与之结合，随后通过改变条件使不同的物质分别被洗脱下来。反相基质的性质决定了结合作用通常特别强，可以通过使用有机溶剂或其它添加剂（离子对试剂）调整这一结合。洗脱通常在增加有机溶剂（常用乙腈）浓度的条件下进行。在结合和分离过程中逐渐浓缩的样品最终以纯化、浓缩的形式被收集。分离过程的主要步骤见图105。

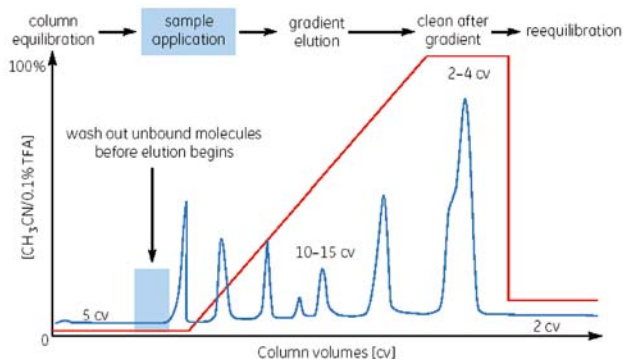


图105：典型的反相色谱梯度洗脱。

反相色谱经常在寡核苷酸和多肽的最终精细纯化步骤中使用，非常适用于分析性分离，如多肽图谱。

如果需维持样品的活性或恢复其高级结构一般不使用反相色谱，因为在有机溶剂存在的情况下多数蛋白会变性。

方法的建立

1. 筛选合适的基质。
2. 选用能够给出可接受分辨率的最佳梯度，对于未知样品开始用0-100%的洗脱缓冲液。
3. 选用维持该分辨率的最高流速和最短分离时间
4. 大规模纯化使用逐步洗脱。
5. 对于强吸附基质的样品换用疏水较弱的基质将更易于洗脱。

进一步信息

《蛋白纯化手册》（货号：18-1132-29）

《疏水作用和反相色谱手册：原理和方法》（货号11-0012-69）

Product index

(Histidine)-tagged proteins

Purification

NI Sepharose High Performance

23, 24, 25, 26, 28–29, **31–33**, 39, 43, 45, 46, 97–98, **201**, 202, 203, 206

HisTrap HP

29, **46–47**, 48, 49, 52–54, 92, 170, 187, 188–190, **203**

His MultiTrap HP

12, 14, 15, 19, 27, 28–29, **39–41**, **202**

His SpinTrap

NI Sepharose 6 Fast Flow

19, 28–29, **43–45**, 93, 99, **203**, 23, 24, 25, 26, 28–30, **34–38**, 39, 46, 55, 61, 66, 69, 70, **201**, 202, 203, 204, 205, 206

HisTrap FF

28–30, **46–47**, 50, 52–54, 103, 170, 188–190, **203**

HisTrap FF crude

15, 27, 28–30, **55–57**, 58, 59, 60, 93, 104, 170, 188, **204**

HisTrap FF crude Kit

28–30, **61–64**, 65, **204**

HisPrep FF 16/10

29–30, 50–51, **70–71**, 170, **205**

His MultiTrap FF

12, 14, 15, 19, 27, 28–30, **39–41**, 42, **202**

His GraviTrap

14, 15, 19, 27, 28–30, **66–68**, 69, 93, **204**

His GraviTrap Kit

28–30, **66–68**

IMAC Sepharose High Performance

25, 26, 72–73, **74–76**, 80, 102, **207**, 208, **210**

HiTrap IMAC HP

72–73, **80–82**, 83, 102, 170, **208–209**

IMAC Sepharose 6 Fast Flow

25, 26, 72–73, **77–79**, 80, 84, 87, 100–101, 170, **207**, 208, 209, **210**

HiTrap IMAC FF

72–73, **80–82**, 85–87, 100–101, **208–209**

HiPrep IMAC FF 16/10

73, **84–85**, 85–87, 170, **209**

His Buffer Kit

25, 30, 43, 44, 66

Detection

Anti-His antibody

69, 88, **89–90**, 94

GST-tagged proteins

Protein expression

pGEX vectors

105, **106**, 107, 110–111, 138, 140, 144, 146, 148, 150, 158, **224–225**

Purification

Glutathione Sepharose High Performance

105, 108, 109, 112, **114–119**, 126, 127, 129, 138, 156, 163–165, 166, 167, **211**, 212, 214

GSTrap HP

109, 113, **126–128**, 129, 132, 138–139, 154–155, 159, 167, 170, **212–213**

Glutathione Sepharose 4 Fast Flow

105, 108, 109, 112, **114–119**, 120, 126, 134, 135, 138, 156, 163–165, 166, 167, **211**, 212, 213, 214

GSTrap FF

109, 113, **126–128**, 130, 132–133, 135–137, 138, 139, 153, 154–155, 156–157, 158, 160, 161, 162–163, 167, 170, **212–213**

GSTPrep FF 16/10

109, 113, **134–135**, 135–137, 156, 170, **213**

GST MultiTrap FF

14, 15, 19, 107, 109, 113, **120–123**, 124, 154–155, **212**

Glutathione Sepharose 4B

105, 108, 109, 112, 113, **114–119**, 120, 125, 126, 138, 156, 163–165, 166, 167, **211**, 212, 214

GSTrap 4B

109, 113, **126–128**, 131, 132, 138, 139, 154–155, 167, 170, **212–213**

GST SpinTrap Purification Module

19, 107, 109, 113, **125**, 154–155

GST MultiTrap 4B

14, 15, 19, 107, 109, 113, **120–123**, 154–155, **212**

Detection

GST Detection Module

110, 113, **144–145**, 151

GST 96-Well Detection Module

110, **142–144**

Anti-GST Antibody

17, 110, 141, 142–143, 146, 148, 151

Anti-GST HRP Conjugate

110, 148–149

Tag cleavage

Enzymes

Thrombin

106, 110, 111, 140, 141, 153, 154, 156–157, 160, 161, 162–165, 166, 167, 225

Factor Xa

106, 110, 111, 140, 141, 153, 154, 156–157, 162–165, 166, 167, 225

PreScission Protease

11, 91, 106, 110, 140, 141, 153, 154, 156–157, 158, 159, 162–164, 166, 167, 225

Removal of thrombin and Factor Xa

HiTrap Benzamidin FF

(high sub)

111, 153, 154–155, 157, 160, 161, 163, 165, 167, 170

Benzamidin Sepharose 4 Fast Flow (high sub)

111, 228

Companion products

Western blotting

detection products

69, 88, 89–90, 110, 146–147, 148–149, 151, 152, 152, 167

Desalting and buffer exchange

HiTrap Desalting

26, 27, 33, 36, 63, 64, 76, 79, 101, 112, 113, 127, 132, 134, 155, 162, 165, 166, 189, 191, 192, **194–195**, 196, 197, 215

HiPrep 26/10 Desalting

26, 27, 33, 36, 63, 64, 76, 79, 86, 92, 101, 104, 112, 127, 132, 134, 162, 166, 189, 192, 196, 197, **198–199**, 215

PD-10 column

26, 27, 33, 34, 36, **37–38**, 63, 64, 76, 79, 101, 112, 127, 132, 134, 165, 166, 191, 192, **193**, 215, 221

HiLoad gel filtration products

60, 92, 103, 131, 159, 181, 182, 183

Empty columns

31, 34, 74, 77, 98, 116, 117, 118, 181, 219, 220, 221, 223

Related literature

	Code No.
Handbooks	
GST Gene Fusion System	18-1157-58
Affinity Chromatography: Principles and Methods	18-1022-29
Antibody Purification	18-1037-46
Gel Filtration: Principles and Methods	18-1022-18
Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography: Principles and Methods	11-0012-69
Ion Exchange Chromatography and Chromatofocusing: Principles and Methods	11-0004-21
Protein Purification	18-1132-29
Challenging Protein Purification	28-9095-31
2-D Electrophoresis	80-6429-60
Selection guides/brochures	
Ni Sepharose and IMAC Sepharose, selection guide	28-4070-92
Affinity Columns and Media, selection guide	18-1121-86
Convenient Protein Purification, HiTrap column guide	18-1129-81
Gel Filtration Columns and Media, selection guide	18-1124-19
Ion Exchange Columns and Media, selection guide	18-1127-31
Prepacked chromatography columns with ÄKTA design systems, selection guide	18-1173-49
Protein purification—applications that meet your needs, application brochure	11-0027-81
CD	
Column Packing CD—The Movie	18-1165-33
The Protein Purifier—Software-based learning aid for purification strategies	18-1155-49
Data files and application notes	
Ni Sepharose 6 Fast Flow, HisTrap FF, and HisPrep FF 16/10 columns	11-0008-86
Ni Sepharose High Performance and HisTrap HP columns	18-1174-40
HisTrap FF crude columns and HisTrap FF crude Kit	11-0012-37
His GraviTrap	11-0036-90
His MultiTrap FF and His MultiTrap HP	11-0036-63
His SpinTrap	28-4046-59
IMAC Sepharose 6 Fast Flow, HiTrap IMAC FF, and HiPrep IMAC FF 16/10 columns	28-4041-06
IMAC Sepharose High Performance and HiTrap IMAC HP columns	28-4041-05
Glutathione Sepharose High Performance and GSTrap HP columns	18-1174-32
Glutathione Sepharose 4 Fast Flow, GSTPrep FF 16/10, and GSTrap FF	18-1136-89
GSTrap 4B columns	28-4048-14
GST MultiTrap FF, GST MultiTrap 4B	28-4081-57
Addition of imidazole during binding improves purity of histidine-tagged proteins	28-4067-41

Ordering information

Product	Quantity	Code No.
Histidine-tagged proteins		
Purification		
Ni Sepharose High Performance	25 ml	17-5268-01
	100 ml*	17-5268-02
HisTrap HP	5 × 1 ml	17-5247-01
	100 × 1 ml†	17-5247-05
	1 × 5 ml	17-5248-01
	5 × 5 ml	17-5248-02
	100 × 5 ml†	17-5248-05
His MultiTrap HP	4 × 96-well filter plates	28-4009-89
His SpinTrap	50 × 100 µl	28-4013-53
Ni Sepharose 6 Fast Flow	5 ml	17-5318-06
	25 ml	17-5318-01
	100 ml	17-5318-02
	500 ml*	17-5318-03
HisTrap FF	5 × 1 ml	17-5319-01
	100 × 1 ml†	17-5319-02
	5 × 5 ml	17-5255-01
	100 × 5 ml†	17-5255-02
HisTrap FF crude	5 × 1 ml	11-0004-58
	100 × 1 ml†	11-0004-59
	5 × 5 ml	17-5286-01
	100 × 5 ml†	17-5286-02
HisTrap FF crude Kit	3 × 1 ml, buffers	28-4014-77
HisPrep FF 16/10	1 × 20 ml	17-5256-01
His MultiTrap FF	4 × 96-well filter plates	28-4009-90
His GraviTrap	10 × 1 ml	11-0033-99
His GraviTrap Kit	20 × 1 ml, buffers	28-4015-51
IMAC Sepharose High Performance	25 ml	17-0920-06
	100 ml*	17-0920-07
HiTrap IMAC HP	5 × 1 ml	17-0920-03
	5 × 5 ml	17-0920-05
IMAC Sepharose 6 Fast Flow	25 ml	17-0921-07
	100 ml*	17-0921-08
HiTrap IMAC FF	5 × 1 ml	17-0921-02
	5 × 5 ml	17-0921-04
HiPrep IMAC FF 16/10	1 × 20 ml	17-0921-06
His Buffer Kit		11-0034-00
HiTrap Chelating HP	5 × 1 ml	17-0408-01
	1 × 5 ml	17-0409-01
	5 × 5 ml	17-0409-03
	100 × 5 ml†	17-0409-05
Chelating Sepharose Fast Flow	50 ml	17-0575-01
	500 ml*	17-0575-02
Detection		
Anti-His antibody	170 µl	27-4710-01

Product	Quantity	Code No.
GST-tagged proteins		
Protein expression		
pGEX- 4T-1	25 µg	27-4580-01
pGEX- 4T-2	25 µg	27-4581-01
pGEX- 4T-3	25 µg	27-4583-01
pGEX- 5X-1	25 µg	27-4584-01
pGEX- 5X-2	25 µg	27-4585-01
pGEX- 5X-3	25 µg	27-4586-01
pGEX- 6P-1	25 µg	27-4597-01
pGEX- 6P-2	25 µg	27-4598-01
pGEX- 6P-3	25 µg	27-4599-01
All vectors include <i>E. coli</i> B21		
Purification		
Glutathione Sepharose High Performance	25 ml	17-0579-01
	100 ml*	17-0579-02
GSTrap HP	5 × 1 ml	17-5281-01
	100 × 1 ml†	17-5281-05
	1 × 5 ml	17-5282-01
	5 × 5 ml	17-5282-02
	100 × 5 ml†	17-5282-05
Glutathione Sepharose 4 Fast Flow	25 ml	17-5132-01
	100 ml	17-5132-02
	500 ml*	17-5132-03
GSTrap FF	2 × 1 ml	17-5130-02
	5 × 1 ml	17-5130-01
	100 × 1 ml†	17-5130-05
	1 × 5 ml	17-5131-01
	5 × 5 ml	17-5131-02
	100 × 5 ml†	17-5131-05
GSTPrep FF 16/10	1 × 20 ml	17-5234-01
GST MultiTrap FF	4 × 96-well filter plates	28-4055-01
Glutathione Sepharose 4B	10 ml	17-0756-01
	100 ml (function tested)	27-4574-01
	300 ml*	17-0756-04
GSTrap 4B	5 × 1 ml	28-4017-45
	100 × 1 ml†	28-4017-46
	1 × 5 ml	28-4017-47
	5 × 5 ml	28-4017-48
	100 × 5 ml†	28-4017-49
GST SpinTrap Purification Module	50 × 50 µl	27-4570-03
GST MultiTrap 4B	4 × 96-well filter plates	28-4055-00
Detection		
GST Detection Module	50 detections	27-4590-01
GST 96-Well Detection Module	5 plates	27-4592-01
Anti-GST Antibody	0.5 ml, 50 detections	27-4577-01
Anti-GST HRP Conjugate	75 µl	RPN1236

Product	Quantity	Code No.
Tag cleavage		
Enzymes		
Thrombin	500 units	27-0846-01
Factor Xa	400 units	27-0849-01
PreScission Protease	500 units	27-0843-01
Removal of thrombin and Factor Xa		
HiTrap Benzamidine FF (high sub)	2 × 1 ml	17-5143-02
	5 × 1 ml	17-5143-01
	1 × 5 ml	17-5144-01
Benzamidine Sepharose 4 Fast Flow (high sub)	25 ml*	17-5123-10
Companion products		
<i>E. coli</i> B21	1 vial	27-1542-01
Isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG)	1 g	27-3054-03
	5 g	27-3054-04
	10 g	27-3054-05
Western blotting		
Hybond-P	10 sheets	RPN2020F
Hybond-ECL	10 sheets	RPN2020D
ECL Western Blotting		
Anti-GST HRP Conjugate	75 µl	RPN1236
ECL GST Western Blotting Detection Kit	1 kit	RPN1237
Detection Reagents	for 1000 cm ²	RPN2109
ECL Plus Western Blotting		
Detection System	for 1000 cm ²	RPN2132
Desalting and buffer exchange		
PD-10 Desalting Columns	30	17-0851-01
HiTrap Desalting	5 × 5 ml	17-1408-01
	100 × 5 ml†	17-1408-05
HiPrep 26/10 Desalting	1 × 53 ml	17-5087-01
	4 × 53 ml	17-5087-02
Gel filtration		
HiLoad 16/60 Superdex 30 pg	1 × 120 ml	17-1139-01
	1 × 320 ml	17-1140-01
HiLoad 16/60 Superdex 75 pg	1 × 120 ml	17-1068-01
	1 × 320 ml	17-1070-01
HiLoad 16/60 Superdex 200 pg	1 × 120 ml	17-1069-01
	1 × 320 ml	17-1071-01
HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR	1 × 120 ml	17-1165-01
	1 × 320 ml	17-1194-01
HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR	1 × 120 ml	17-1166-01
	1 × 320 ml	17-1195-01
HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR	1 × 120 ml	17-1167-01
	1 × 320 ml	17-1196-01

* Larger quantities are available; please contact GE Healthcare.

† Special pack size delivered on specific customer order

Product	Quantity	Code No.
Empty columns		
Complete information on the range of Tricorn columns is available at www.gehealthcare.com/protein-purification-labresearch		
Tricorn 5/100 column	1	18-1163-10
Tricorn 5/150 column	1	18-1163-11
Tricorn 5/200 column	1	18-1163-12
Tricorn 10/100 column	1	18-1163-15
Tricorn 10/150 column	1	18-1163-16
Tricorn 10/200 column	1	18-1163-17
<i>Tricorn columns are delivered with a column tube, adaptor unit, end cap, a filter kit containing adaptor and bottom filters and O-rings, two stop plugs, two fingertight fittings, adaptor lock and filter holder, and two M6 connectors for connection to FPLC™ System, if required.</i>		
XK 16/20 column	1	18-8773-01
XK 26/20 column	1	18-1000-72
XK 50/20 column	1	18-1000-71
<i>XK columns are delivered with one AK adaptor, TEFZEL tubing (0.8 mm i.d. for XK 16 and XK 26 columns, 1.2 mm i.d. for XK 50 columns, with M6 connectors, thermostatic jacket, support snap-on net rings, dismantling tool (XK 16 and XK 26 only), and instructions.</i>		
HR 16/5 column	1	18-1000-98
HR 16/10 column	1	19-7403-01
HR 16/50 column	1	18-1460-01
<i>HR columns are delivered with a column tube, adaptor unit, end cap, a filter kit containing adaptor and bottom filters and O-rings and M6 male fittings for connection to FPLC System.</i>		
Empty disposable PD-10 Desalting columns	50	17-0435-01
Accessories and spare parts		
For a complete listing refer to GE Healthcare BioDirectory or www.gehealthcare.com/protein-purification		
LabMate PD-10 Buffer Reservoir	10	18-3216-03
Packing Connector XK 16	1	18-1153-44
Packing Connector XK 26	1	18-1153-45
Tricorn packing equipment 10/100		
<i>Tricorn packing equipment 10/100 includes Tricorn packing connector 10-10, Tricorn 10/100 glass tube, bottom unit and stop plug.</i>		
Tricorn packing connector 10-10 [‡]	1	18-1153-25
<i>Connects extra glass column to a Tricorn 10 column to act as a packing reservoir for efficient packing.</i>		
1/16" male/Luer female [‡]	2	18-1112-51
Tubing connector flangeless/M6 female [‡]	2	18-1003-68
Tubing connector flangeless/M6 male [‡]	2	18-1017-98
Union 1/16" female/M6 male [‡]	6	18-1112-57
Union M6 female /1/16" male	5	18-3858-01
Union Luerlock female/M6 female	2	18-1027-12
HiTrap/HiPrep, 1/16" male connector for ÄKTAdesign	8	28-4010-81
Stop plug female, 1/16" [§]	5	11-0004-64
Fingertight stop plug, 1/16" [¶]	5	11-0003-55

[‡] One connector included in each HiTrap package

[§] Two, five, or seven female stop plugs included in HiTrap packages, depending on products

[¶] One fingertight stop plug is connected to the top of each HiTrap column

www.gehealthcare.com/his

GE Healthcare Bio-Sciences AB

Biörkgatan 30

751 84 Uppsala

Sweden

AKTA, AKTAdesign, AKTAcrossflow, AKTAexplorer, AKTAFFLC, AKTApilot, AKTApriime, AKTAprocess, AKTApurifier, AKTAGP, ActiChrom, eCL Advance, eCL Plus, ExcelGel, FPLC, GaviTrap, GSTPrest, GSTTrap, Hiloed, HiPrep, HiSPrep, HiTrap, HiTrap, Hybond, Labmate, MoBioSelect, MoBioSelect Super, MoBioSelect Xtra, Mono Q, Multiphor, MultiTrap, Nac, Percoll, PhastGel, PhastSystem, Precision, PrimeView, Rainbow, RESOURCE, Sephadex, SpinTrap, Sephacryl, Sepharose, SOURCE, SourcePore, Superloop, Tricorn, UNICORN and Drop design are trademarks of GE Healthcare companies. GE, Imagination at work, and GE monogram are trademarks of General Electric Company.

Tricorn column and components are protected by US design patents USD500856, USD506261, USD500555, USD495060 and their equivalents in other countries.

US patent numbers 5,284,933 and 5,310,663, and equivalent patents and patent applications in other countries (*assignee: Hoffmann La Roche, Inc.*) relate to the purification and preparation of fusion proteins and affinity peptides comprising at least two adjacent histidine residues (commonly known as the histidine-tag technology). Any customer that wishes to use Chelating Sepharose Fast Flow, Ni Sepharose 6 Fast Flow, or IMAC Sepharose 6 Fast Flow for non-research/commercial applications under these patents is requested to contact Hoffmann La Roche AG, Corporate licensing, attention Dr Andreas Maurer, CH-4070 Basel, Switzerland; telephone +41 61 687 2548; fax +41 61 687 2113, for the purpose of obtaining a license.

PGEX Vectors are to be used for scientific investigation and research and for no other purpose whatsoever, and a license for commercial use of the licensed products and the processes claimed in the patents must be negotiated directly with Chemicon International Inc by the purchaser prior to such use.

Any use of UNICORN software is subject to GE Healthcare Standard Software End-User License Agreement for Life Sciences Software Products. A copy of this Standard Software End-User License Agreement is available on request.

All third party trademarks are the property of their respective owners.

© 2000-2006 General Electric Company - All rights reserved

First published Dec 2000

All goods and services are sold subject to the terms and conditions of sale of the company within GE Healthcare that supplies them. A copy of these terms and conditions is available on request. Contact your local GE Healthcare representative for the most current information.

GE Healthcare Europe GmbH

Munzinger Strasse 5

D-79111 Freiburg, Germany

GE Healthcare UK Limited

Amersham Place

Little Chalfont

Buckinghamshire, HP7 9NA, UK

GE Healthcare Bio-Sciences Corp.

800 Centennial Avenue

P.O. Box 1327

Piscataway, NJ 08855-1327, USA

GE Healthcare Bio-Sciences KK

Sanken Bldg. 3-25-1

Hyakunincho Shinjuku-ku

Tokyo 169-0073, Japan

Aso Pacific 1 800 455 62751830 F +855 62751830 • Australasia Tel +61 2820 8299 F +61 2820 8280 • Austria Tel +43 757606 163 F +43 757606 164 • Belgium Tel 0800 73 980 F +32 416 826 200 • Canada Tel 1 800 465 5670 F +1 505 567 000 • Central & East Europe Tel +41 91 732 720 F +41 91 732 722 700 • Denmark Tel +45 70 25 40 F +45 46 16 2424 • Eire Tel 1 800 709992 F +353 1404 542010 • Finland & Baltics Tel +358 9 512 3940 F +358 9 512 3943 • France Tel 01 69 35 67 00 F 01 69 35 67 00 • Germany Tel 0800 10800 712 F 0800 10800 712 • Greater China Tel +852 2100 3000 • Indonesia Tel +62 21 6201 3318 • Italy Tel 02 2601 3200 F +39 2601 3999 • Japan Tel 81 3 5331 9316 F 81 3 5331 9317 • Korea Tel 82 2 6201 3700 F 82 2 6201 3801 • Latin America Tel +51 9353 7200 F +51 9353 7304 • Middle East & Africa Tel +30 210 96 00 F +30 210 96 00 695 • Netherlands Tel 0800 82 82 F +30 800 82 82 • Norway Tel +47 815 615 777 F +47 815 615 777 • Poland Tel +48 22 620 10 00 F +48 22 620 10 00 • Portugal Tel +351 21 800 526 89 F +351 21 800 526 89 • Sweden Tel 0800 41 82 45 F +46 800 41 82 45 • Switzerland Tel 0848 0028 10 F 0848 0028 11 • UK Tel 0800 516 313 F 0800 516 392 • USA Tel 1 800 526 3617 F 1 877 295 2951



imagination at work

18-1142-75AC 01/2007