

# 改变上样时咪唑浓度提高(His)<sub>6</sub> - 融合蛋白的纯度

在使用金属螯和层析柱纯化 (His)<sub>6</sub>- 融合蛋白时, 蛋白纯度的提高能通过优化结合缓冲液和样品液中咪唑浓度而实现, 并且达到纯度与产量之间的平衡。咪唑在一个适当的浓度范围能尽量减少未标记蛋白的非特异性吸附, 同时大大增进目标蛋白的纯度。本文用来自牛分枝杆菌的 (His)<sub>6</sub>- 蛋白激酶 G (以下简称 (His)<sub>6</sub>- PknG) 的纯化来说明这个问题。

## 介绍

目标蛋白上连接六个组氨酸是一种常用于纯化重组蛋白的方法。但是天然的宿主蛋白暴露在表面的组氨酸残基和其他的氨基酸复合物也能导致非特异性吸附而结合到金属螯和介质上。在纯化时, 天然蛋白随着融合蛋白一起被洗脱收集, 在接下来的步骤中需要除去这些污染物。通常这些非特异性结合在柱上的杂质要少于目标蛋白, 我们可以用更加严格的条件将他们从目的蛋白中除去。这里有一些方法可以减少杂质结合到镍离子金属螯和柱上: 增加亲和柱上镍离子的数量来满足我们所纯化的蛋白量; 加入咪唑作为竞争性底物减少非特异性吸附。为此所做的试验证明了咪唑的重要性, 它作为一个有利的工具能提高从镍离子亲和柱纯化下来的 (His)<sub>6</sub>-PknG 的纯度。

## 决定最佳的咪唑浓度

利用 (His)<sub>6</sub>-PknG 结合到 Ni Sepharose HP 的试验优化咪唑浓度, 用含 10mM 咪唑的结合缓冲液平衡亲和柱, 上 (His)<sub>6</sub>-PknG 的细胞裂解液。在用缓冲液清洗柱后, 用 20 个 CV 的 0 - 50% B 液 (250mM 咪唑) 做线性梯度洗脱, 最终洗脱液中咪唑的浓度达到 250mM。通过分部收集组份的分析, 发现洗脱下来的大部分杂质集中在 40mM 到 70mM 咪唑浓度之间。(资料没有附上)

## 提高纯度

基于这个发现, 在结合缓冲液和样品中使用相同的咪唑浓度 45mM。为了取得更高的蛋白浓度, 蛋白用两步梯度方法洗脱 (见图 1)。为了便于对照咪唑的作用, 在同样的条件下, 我们进行了另一个纯化试验, 在结合缓冲液和样品液中都不加咪唑 (见图 2), 取分部收集的组份做 SDS-PAGE 电泳, 我们发现在结合缓冲液和样品液中加入 45mM 咪唑时, 样品的纯度有明显的提高 (见图 3)。

## 结论

用一个线性梯度, 我们找到了一个能去掉大部分杂质的咪唑浓度范围, 而不干扰 (His)<sub>6</sub>-PknG 和介质的结合。在上样缓冲液和样品液中使用相同浓度的咪唑 (45mM), 结果得到更高纯度的目的蛋白。

图 1 的层析条件:

层析柱: Ni Sepharose High Performance, 2 ml in XK 16/20  
样品: (His)<sub>6</sub>-tagged PknG in 26 ml E. coli M15 extract  
结合缓冲液: 20 mM Tris, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 1% Triton X-100, 10% 甘油, 10 mM β-巯基乙醇, 45 mM 咪唑  
洗脱液: 20 mM Tris, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 1% Triton X-100, 10% 甘油, 10 mM β-巯基乙醇, 500 mM 咪唑洗脱梯度: 第一步 50% 洗脱 20 CV; 第二步: 100% 洗脱 20 CV  
流速: 1 ml/min  
系统: AKTApurifier 10

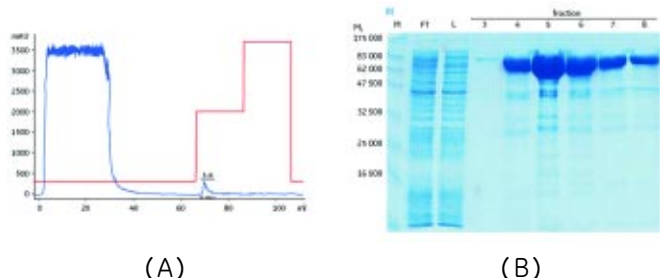


图 1. 在结合缓冲液和样品中加入 45mM 咪唑, 纯化 (His)<sub>6</sub>- PknG 蛋白。

(A) (His)<sub>6</sub>- PknG 纯化层析图。样品为 a 2 l E. coli culture 的裂解物 (样品条件: 26 ml; 用 0.45-μm 针头式滤膜过滤), 用 AKTApurifier 上样到 2 ml 的镍离子亲和层析柱上 (XK 16/20 column) (GE Healthcare)。激酶分别用两种浓度的洗脱液 (50% B 液和 100% B 液) 洗脱。

(B) (His)<sub>6</sub>- PknG 纯化结果 SDS-PAGE 电泳分析 (12% gel)。

M: prestained protein marker, 宽分子量范围 (New England Biolabs); L: 裂解液; FT: 穿过液; 4-8 为 (His)<sub>6</sub>- PknG 的洗脱收集 (最适浓度为 250mM)

图 2 的层析条件:

层析柱: Ni Sepharose High Performance, 2 ml in XK 16/20  
样品: (His)<sub>6</sub>- 标记 PknG in 26 ml E. coli M15 提取液  
结合缓冲液: 20 mM Tris, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 1% Triton X-100, 10% 甘油, 10 mM β-巯基乙醇  
洗脱液: 20 mM Tris, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 1% Triton X-100, 10% 甘油, 10 mM β-巯基乙醇, 500 mM 咪唑

洗脱梯度: 第一步; 50% 洗脱, 20 CV; 100% 洗脱 20 CV  
 流速: 1 ml/min

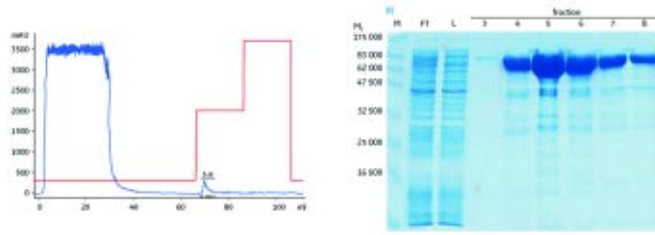


图 2. (His)<sub>6</sub>-PknG 的纯化, 在结合缓冲液和样品液中不加咪唑.  
 (A) (His)<sub>6</sub>-PknG 纯化层析图. 裂解液和层析柱同图 1. 激酶分两步梯度洗脱 (50% B 液和 100 % B 液)  
 (B) SDS-PAGE (12% gel)电泳分析 (His)<sub>6</sub>-PknG 收集组份. M: 同图 1 分子量标准; L: 裂解液; FT: 上样穿过; 4 + l: 含有咪唑的结合缓冲液和样品液上柱纯化的结果 (见图 1). (His)<sub>6</sub>-PknG 主要存在的洗脱组份 4-8 (含有 250 mM 咪唑).

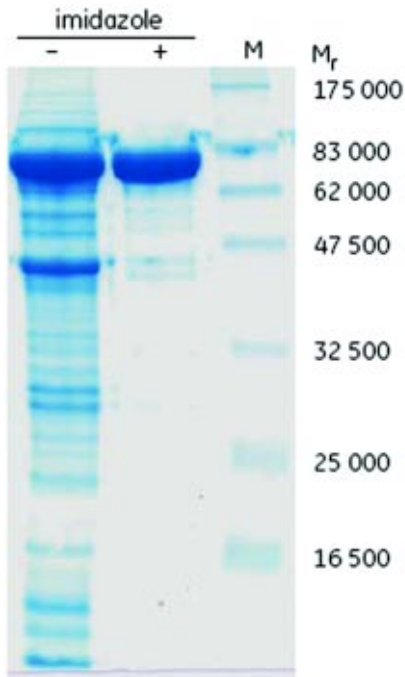


图 3. SDS-PAGE (12% gel) of (His)<sub>6</sub>-PknG 组份. 对比不含咪唑的缓冲液上柱洗脱下(His)<sub>6</sub>-PknG 纯度(-)与含咪唑 (45mM) 缓冲液上柱洗脱下(His)<sub>6</sub>-PknG 的纯度(+). M: 分子量标准 (见图 1)

详细资料请参阅 [www.gehealthcare.com/his](http://www.gehealthcare.com/his)  
[www.gehealthcare.com/protein-purification](http://www.gehealthcare.com/protein-purification)