

在 ÄKTExpress 层析系统上对带(His)₆ 和 GST 标记的融合蛋白的自动多步纯化方法进行优化

介绍

ÄKTExpress™是全自动多维层析系统,专用于大规模纯化带(His)₆和谷胱苷肽 S- 转移酶(GST)标记的融合蛋白。初步优化的纯化方法可以方便的通过 UNICORN™ 软件中的 wizard 编程向导建立,需进一步优化的纯化方法能用软件里的高级区域中的专用部分来完成。为了增加融合蛋白的纯度,每步中的纯化参数都可以被编辑和修改。本文描述了纯化带(His)₆标记激酶的两个不同的途径。

- 在亲和洗脱前的清洗步骤中增加咪唑浓度。
- 在离子交换洗脱时用平缓的梯度洗脱。

ÄKTExpress

- 自动化多维纯化融合蛋白
- 用 wizard 编程向导能方便的建立一个纯化方案
- 在中间步骤的智能峰检测和收集
- 可选择在柱上切掉标记的(His)₆和 GST
- 每个模块能最多纯化 4 个样品
- 一台电脑能平行控制 12 个模块



图 1. 包括四个模块的 ÄKTExpress 系统

所有的方法都是由亲和层析开始,接下来是脱盐,离子交换和凝胶过滤等不同方法的组合。每一步纯化收集到的最大峰转移到下一个柱进行纯化。

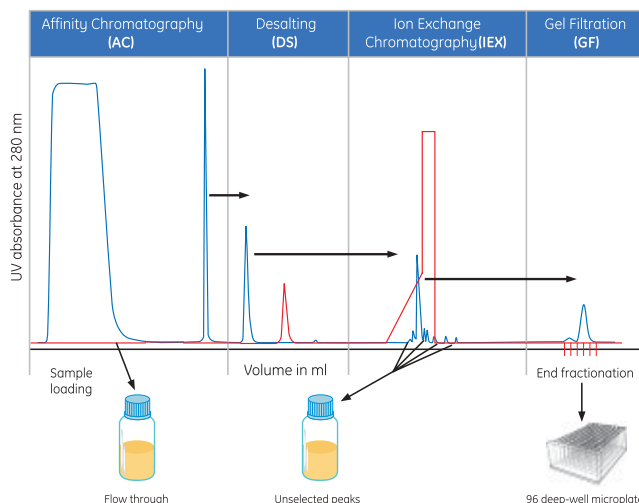


图 2. 自动化四步纯化融合蛋白的示意图。

表格 1. ÄKTExpress 提供多维纯化方法的优点

选择多步纯化方法	增加层析步骤带来的影响
亲和 AC- 脱盐 DS	缓冲液置换
亲和 AC- 凝胶过滤 GF	从不要的聚合物和污染物中分离
亲和 AC- 脱盐 DS- 离子交换 IEX	从其他的异构体中分离 (例如: 异源的磷酸化或糖基化蛋白)
亲和 AC- 脱盐 DS- 离子交换 IEX- 脱盐 DS	在离子交换和脱盐柱的缓冲液置换时从异构体中分离
亲和 AC- 脱盐 DS- 离子交换 IEX- 凝胶过滤 GF	在离子交换和凝胶过滤去除不要的聚合物和污染物时从异构体中分离

材料和方法

样品

A (His)₆ 标记融合蛋白 (分子量 42.4x103, 等电点 5.75) 在本次研究中采用大肠杆菌表达

缓冲液

AC 结合缓冲液: 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5 mM 咪唑, 1 mM DTT, 10% 甘油, pH 8

AC 洗脱缓冲液: 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 500 mM 咪唑, 1 mM DTT, 10% 甘油, pH 8

DS 和 IEX 结合缓冲液: 50 mM Tris-HCl, 25 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% 甘油, pH 7.5

IEX 洗脱缓冲液: 50 mM Tris-HCl, 1M NaCl, 1 mM DTT, 10% 甘油, pH 7.5

GF 缓冲液: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% 甘油, pH 7.5

层析柱

AC: HisTrap™ HP, 1 ml

DS: HiPrep™ 26/10 Desalting

IEX: MonoQ™ 5/50 GL, 1 ml

GF: HiLoad™ 16/60 Superdex? 75 µg

分析

用8-18 % SDS – PAGE还原电泳进行纯度分析(考马斯亮蓝染色), 大约每个泳道上样 7.5 µg 蛋白质。

高级区域



图 3: 两页来自 wizard 编程向导的高级区域的界面

当建立一个AKTExpress 的方法时, 可以用 wizard 编程向导中的高级区域去检查和编辑参数。在高级区域中第一页(见图3)上方法的几个部分的选择可以改变。在下一页, 能看到变量, 并且能用直接的方法编辑这些变量。

在高级区域中有许多的变量可进行优化, 其中一些记录如下。

附加的亲洗脱: 通过严格的洗脱条件(例如: 增加咪唑的浓度) 结合较弱的和非特异性结合的蛋白就被去掉。这样能增加最终的纯度。

离子交换洗脱梯度: 为了在离子交换柱上提高分离度, 降低洗脱流速, 或者改变洗脱的参数(洗脱长度和目标浓度)。

峰检测: 对于峰检测, 当默认的设定没有达到要求, 实验室参数可以根据柱子的不同而选择和优化。

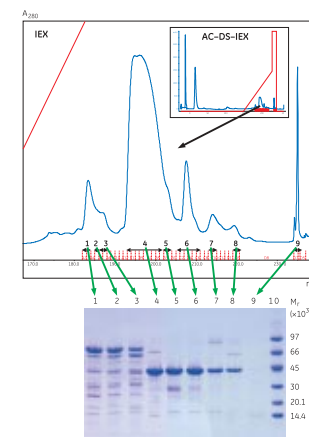
表 2. 在四步纯化中使用变量的例子

技术	变量	默认设置
亲和层析(AC)	附加洗脱	0% B 持续 20 CV
	峰监控参数	由柱子决定
脱盐(DS)	峰监控参数	由柱子决定
离子交换(IEX)	流速	由柱子决定
	梯度设定	0-50% B 持续 20 CV
	峰监控参数	由柱子决定
凝胶过滤(GF)	峰监控参数	由柱子决定

亲和层析和离子交换层析步骤的优化

图 4

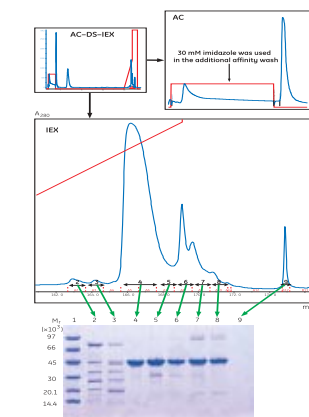
AC-DS-IEX 默认条件试验



1. 低分子量标准
2. 起始样品
3. 流穿
- 4-9 层析中相应的收集组份
10. 低分子量标准

图 5

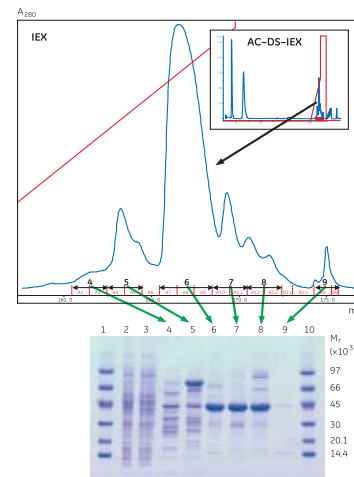
AC-DS-IEX 带额外的清洗



1. 低分子量标准
- 2-9. 层析中对应的相应的收集组份

图 6

AC-DS-IEX 带 80 CV IEX 盐浓度



- 1-9. 层析中对应的相应的收集组份
10. 低分子量标准

(下接第 24 页)