

Ni-NTA纯化His-tag蛋白

His-tag是由6个组氨酸组成的蛋白纯化标签,其组氨酸上的咪唑环可以与二价金属离子结合,无论表达的蛋白是可溶的或者包涵体都可以用固定金属离子亲和层析(IMAC)纯化。His-tag分子量小,只有不到0.84 KDa,基本不改变蛋白质的生物结构和溶解性,有良好的亲和纯化标签。His-tag可以被 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 结合,本Protocol使用Ni-NTA Agarose对His-tag融合表达蛋白进行纯化,是实验室保留Protocol

实验前1天

1. 配制5 M咪唑储液,称取17.02g咪唑,溶解于50 mL超纯水中,0.45 μm 滤膜过滤除菌,避光4°C可保存1-2年
2. 根据样品数量,配制Binding Buffer,每次1L菌液提蛋白配制500mL便足够使用,溶解定容后于4°C冰箱预冷、保存

Binding Buffer (pH8.0)	M _w	终浓度	500mL	1L
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	156.01	50mM	3.90g	7.80g
NaCl	58.44	300mM	8.77g	17.53g
5M Imidazole储液(500×)	68.08	10mM	1 mL	2 mL

- 不同盐离子浓度影响蛋白质的结合,最低使用300mM,最高使用2M
- 使用NaOH调pH至8.0

实验当天

2. 提前15分钟将-80°C冻存菌体取出放在冰上解冻,倒取30 mL提前预冷的Binding Buffer,加300 μL PMSF颠倒混匀(100mM, 100×, 不会结冻, 现用现取即可)

PMSF是蛋白酶抑制剂,其遇水开始降解,在去除菌体前需要每隔1小时加一次

3. 先在菌体中加入5 mL Binding Buffer(含PMSF),在冰上将菌体重悬(防止移液器吸入菌液)转移到50mL小烧杯中,后涮洗菌体管,将30 mL Binding Buffer全部转移到50mL小烧杯中
4. 小烧杯用Parafilm膜封口,防止碎冰块掉入菌液中污染样品,将小烧杯放在200mL烧杯的冰中固定后,进行超声破碎;在清洗超声波转头后设置超声条件为: 工作6s, 暂停8s, 功率300W, 共15分钟,超声过程保证声音清亮、转头没有触壁、防止温度过高
5. 超声期间跟何群课题组借大离心机,换好 **JA25.5的转子**,登记时间,4°C预冷
6. 在菌液澄清后取 **全菌样品20 μL** ,立即加入20 μL 2×SDS Loading Buffer,混匀
7. 使用预冷的超高速离心机配套的离心管配平碎菌液,4°C、15000rpm、15min离心后将上清倒入新的离心管,4°C、15000rpm再次离心15min一次

8. 离心期间从4°C冰箱中取出800 μ L Ni-NTA Agarose(1L菌的用量), 短离后吸出上清, 用1 mL Binding Buffer涮洗3次, 最后一次将洗好的Beads存放在Binding Buffer中, 冰上保存
9. 取 **上清样品20 μ L**, 立即加入20 μ L 2 \times SDS Loading Buffer, 混匀
10. 离心完成后将上清用三层擦镜纸滤入新预冷的50mL管中, 补加Binding Buffer至50mL, 加入洗好Beads, 加入500 μ L PMSF, 4°C冰箱中Roter, 结合1hr
11. 结合1小时期间需要提前预冷4°C大离心机, 配制合适浓度的SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 选择并清洗出一个流速较快的层析柱
12. 取200mL Binding Buffer加入咪唑到 **终浓度20 mM** (0.8 mL 5 M 咪唑储液到咪唑基底溶液), 混匀后配制为 **Wash Buffer**
! 洗杂用的咪唑浓度可以再适度加高, 从而有效降低非特异性结合, 但一般不超过80 mM
13. 结合后4°C、4000 rpm离心1 min将Beads富集到管底, 倒去大部分流出液于新的管中, 剩余约5 mL将Beads重悬并倒入柱子, 用小烧杯接住洗脱液, 固定好柱子, 放于4°C冰箱中
14. 取 **流出液20 μ L**, 加入20 μ L 2 \times SDS Loading Buffer, 混匀
15. 待液面下降到接近Beads后, 加入Wash Buffer洗去结合的杂蛋白, 至少洗杂50 mL的Wash Buffer, 注意不要流干(可以用Wash Buffer涮洗Beads管)
16. 在第二次时可用蓝枪头将Beads重悬起来, 然后用黄枪头取 **结合后Beads样品5 μ L**, 立即加入5 μ L 2 \times SDS Loading Buffer
17. 洗杂期间取10mL Binding Buffer加入咪唑到终浓度250 mM (10 mL 基底溶液中加入500 μ L 5 M 咪唑储液), 混匀后配制为 **Elution Buffer**
18. 将层析柱下部封住, 加入1 mL Elution buffer重悬Beads, 用Parafilm膜封住管口, 室温轻摇15min进行洗脱
19. 期间在冰上预冷1.5 mL洗脱管, 取100 μ L 5 \times 考马斯亮蓝G250, 加入400 μ L超纯水稀释后, 100 μ L分装到1.5mL管, 打开预热95°C金属浴
20. 洗脱完成后, 在冰上收集至1.5mL离心管中, 后吸取5 μ L蛋白到100 μ L 考马斯亮蓝G250中, 混合后观察是否变色, 重复步骤洗脱, 洗脱2-3管至考马斯亮蓝G250不再变蓝, 确保洗脱完全
! 如果第一次蛋白洗脱后G250变色就很轻, 即洗脱效率不高时, 可用1 mL 0.1 M Glycine室温洗脱2-3分钟, 收集前在洗脱管中提前加入115 μ L Tris·HCl pH=8.5后接取洗脱液
21. 洗脱后用蓝枪头将Beads重悬起来, 然后用黄枪头取 **洗脱后Beads样品5 μ L**, 立即加入5 μ L 2 \times SDS Loading Buffer; 取 **5 μ L不同洗脱管中蛋白**, 分别加入5 μ L 2 \times SDS Loading Buffer
22. 95°C煮样5分钟, 离心后通过SDS-PAGE检测蛋白质提取质量, 可按照以下顺序上样: 10 μ L全菌、10 μ L上清、10 μ L流出液、10 μ L结合后Beads、10 μ L洗脱后Beads、10 μ L洗脱蛋白、10 μ L不同浓度的BSA