

# 高纯度His标签蛋白表达纯化方案设计

常州天地人和生物科技有限公司

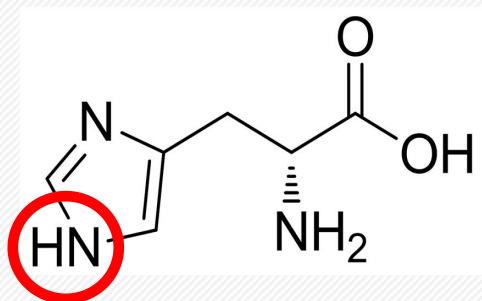
smart-lifesciences

# 一、His标签蛋白纯度不高？

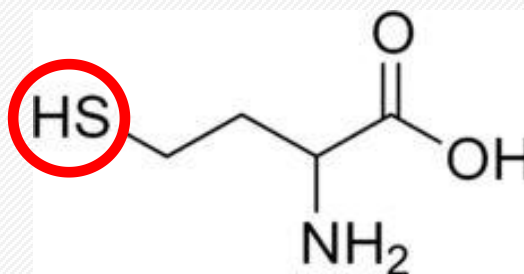
## 1、固定化金属螯合层析 (IMAC)

$\text{Ni}^{2+}$  ,  $\text{Co}^{2+}$  ,  $\text{Cu}^{2+}$  ,  $\text{Zn}^{2+}$ 等过渡金属离子可与固定金属离子亲和色谱是基于蛋白质分子表面的组氨酸的咪唑基、半胱氨酸的巯基和色氨酸的吲哚基形成稳定的螯合物而进行分离的。

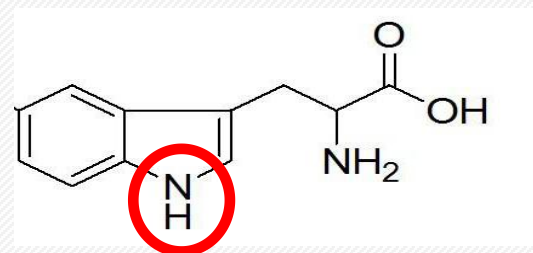
$\text{Al}^{3+}$  ,  $\text{Fe}^{3+}$ 适合捕获磷酸化蛋白质和磷酸化肽。



组氨酸



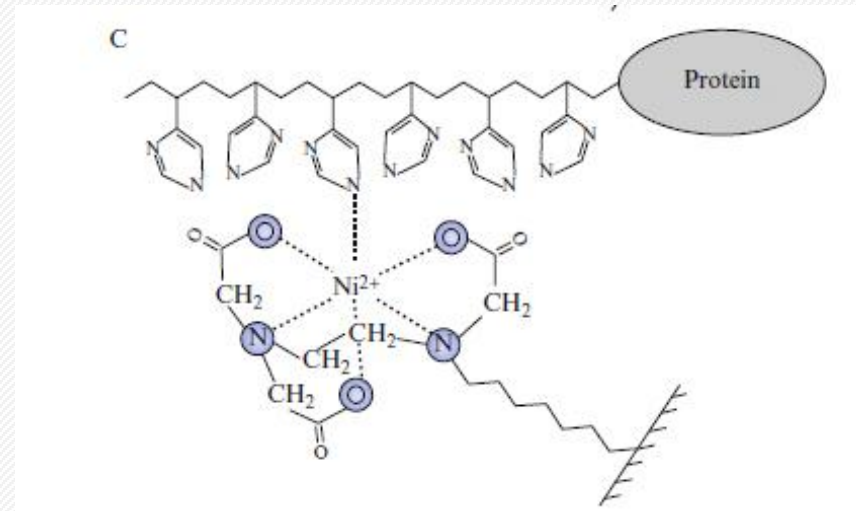
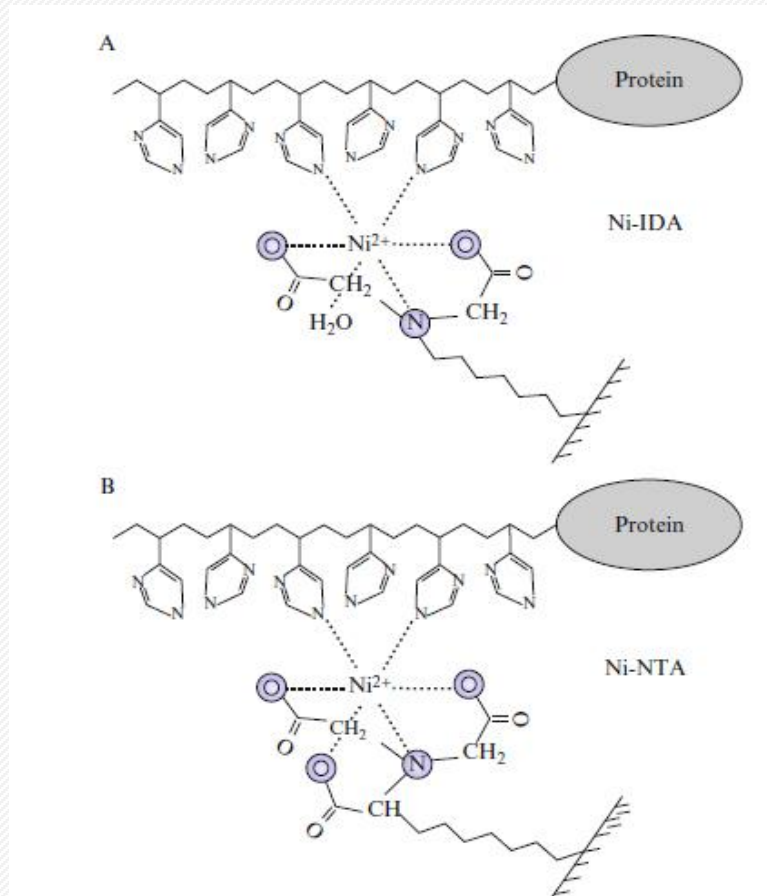
半胱氨酸



色氨酸

# 一、His标签蛋白纯度不高？

## 2、纯化介质的选择



# 一、His标签蛋白纯度不高？

## 3、蛋白质共纯化

### 大肠杆菌

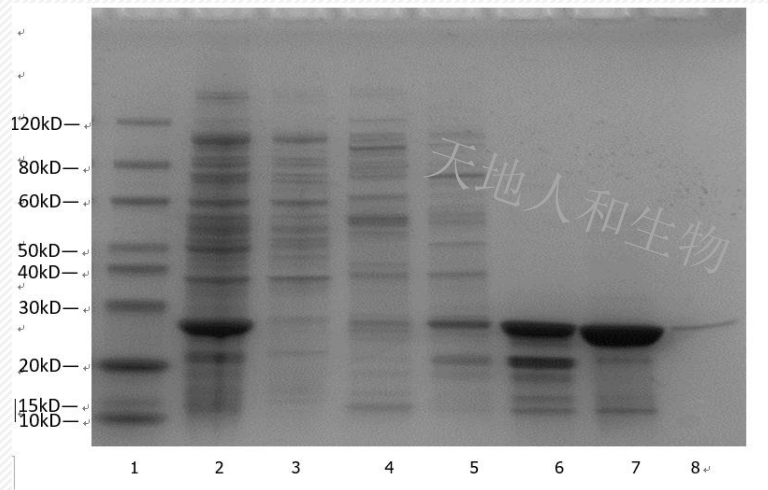
- 带有天然技术结合序列的蛋白质
- 表面带有组氨酸簇的蛋白质（例如SlyD蛋白21kd）
- 与异源表达的His标记蛋白结合的蛋白质，如通过分子伴侣结合的蛋白质
- 与琼脂糖载体有亲和力的蛋白质（Bolanos-Garcia and Davies, 2006）

### 哺乳动物细胞

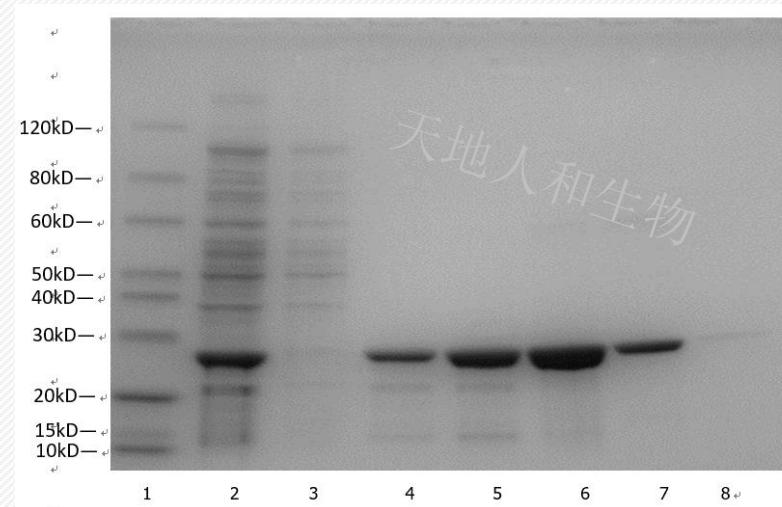
- 人体细胞的转录因子TFIIA的 $\alpha$ 亚基-7个连续暴露在表面的组氨酸残基（55kd或35kd）
- 人类转录因子YY1-11个连续组氨酸

## 二、提高纯度和载量

### 1、更换螯合金属离子



Ni NTA Beads 6FF



Co NTA Beads 6FF

Line 1: Marker  
Line 2: Load  
Line 3: FT  
Line 4: 5mM Imidazole  
Line 5: 20mM Imidazole  
Line 6: 50mM Imidazole  
Line 7: 100mM Imidazole  
Line 8: 250mM Imidazole

## 二、提高纯度和载量

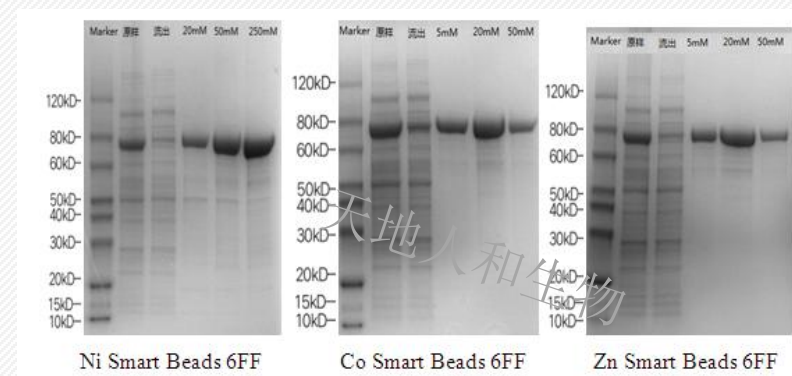
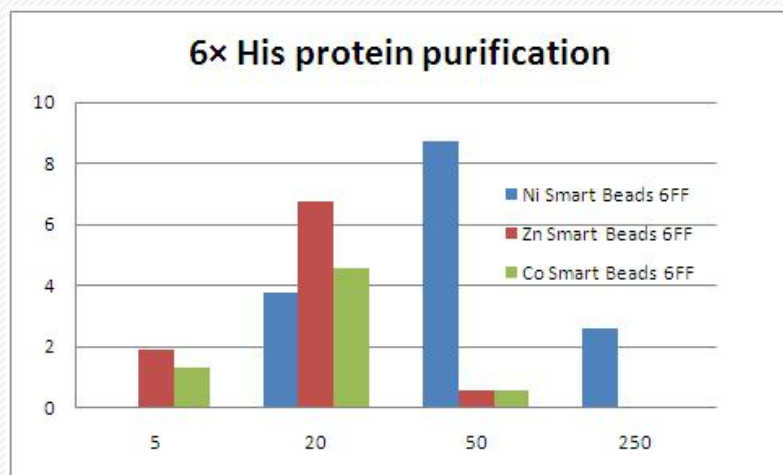
### 金属离子的种类

金属离子结合强弱顺序： $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+}$

金属离子半径

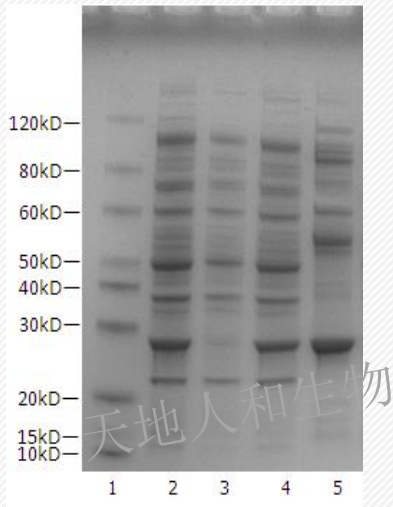
金属离子结合能力

目的蛋白纯度： $\text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$

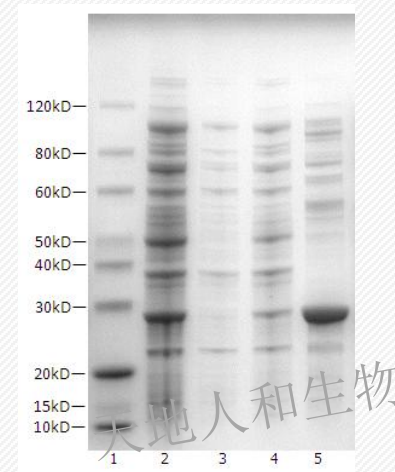


## 二、提高纯度和载量

### 2、更换配体



Ni IDA Beads 6FF



Ni NTA Beads 6FF

### 三、提高纯度和载量

Affinity of poly-histidine fusion proteins for the Ni<sup>2+</sup>-NTA adsorbent in 6M GuHCl and 0.5M phosphat buffer.

Fusion protein	Phosphate		GuHCl	
	Retained(%)	Eluted(%)	Retained(%)	Eluted(%)
(His) <sub>2</sub> -DHFR	30	10	<5	-
(His) <sub>3</sub> -DHFR	90	75	<10	-
(His) <sub>4</sub> -DHFR	>90	80	10	10
(His) <sub>5</sub> -DHFR	>90	20	50	50
(His) <sub>6</sub> -DHFR	>90	10	>90	90
DHFR-(His) <sub>2</sub>	>90	90	<5	-
DHFR-(His) <sub>3</sub>	>90	80	<10	-
DHFR-(His) <sub>4</sub>	>90	50	10	10
DHFR-(His) <sub>5</sub>	>90	40	50	50
DHFR-(His) <sub>6</sub>	>90	30	>90	90
mDHFR*	<5	-	-	-

对于His-Tag的设计最普通的是6-8个His串联的方案，但对于不同种类的蛋白设计方案很多，包括一些专利设计。

His tag		Reference/vector
H HH HH H	H <sub>6</sub>	Hochuli <i>et al.</i> (1988)
H HH HH HH H	H <sub>8</sub>	pQE-TriSystem,pTriEx
H HH HH HH HH H	H <sub>10</sub>	pQE-TriSystem-5,-6
H HH HH HH HH HH HH H	H <sub>14</sub>	Pedersen <i>et al.</i> (1999)
H QH QH QH QH QH Q	(HQ) <sub>6</sub>	
H NH NH NH NH NH N	(HN) <sub>6</sub>	US patent 7176298
H GH GH GH GH GH Q	(H G/Q) <sub>6</sub>	Pedersen <i>et al.</i> (1999)
H HQ HH AH HG	(HHX) <sub>3</sub>	Pedersen <i>et al.</i> (1999)
K DH LI HN VH KE H	HAT	Imai <i>et al.</i> ,2001 and US patent 7176298
A HA H N K		
(HX*) <sub>3-6</sub>	(HX <sup>a</sup> ) <sub>n</sub>	US patent 5594115
H X <sub>1</sub> H R H X <sub>2</sub> H <sup>b</sup>	(HXH) <sub>2</sub> R	US patent application 2004/0029781

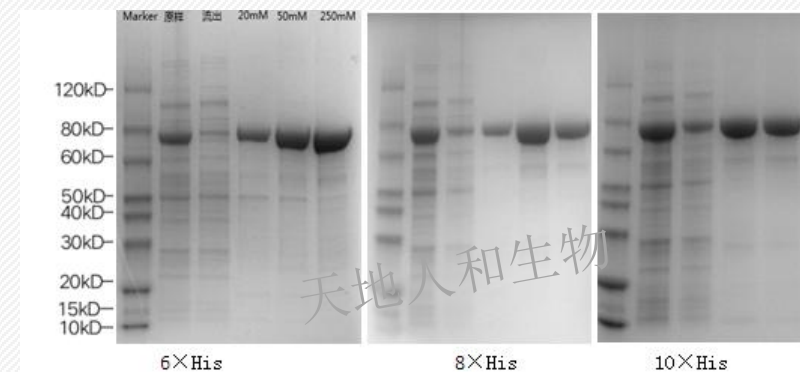
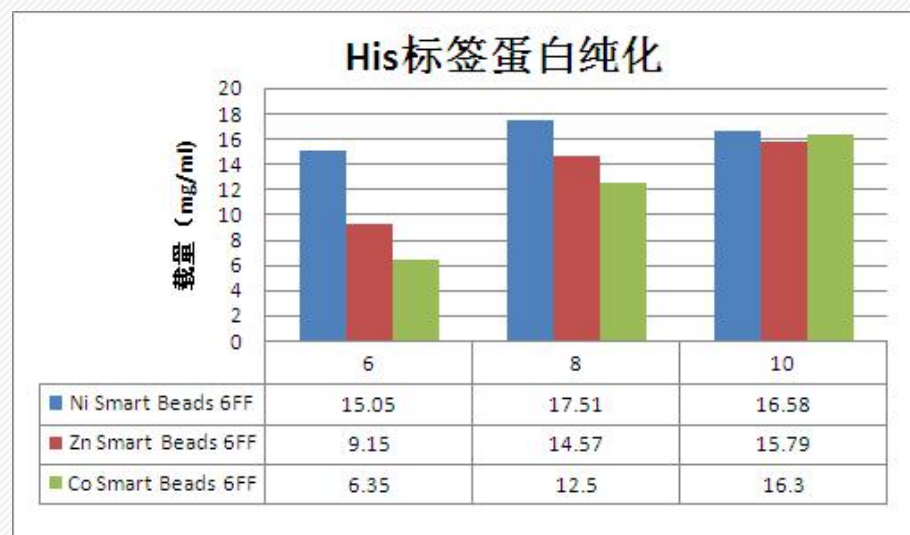
<sup>a</sup>X can be D,E,P,A,G,V,S,L,I and T.

<sup>b</sup>X<sub>1</sub> can be A,R,N,D,Q,E,I,L,F,P,S,T,W,V; X<sub>2</sub>can be A,R,N,D,C,Q,E,G,I,L,K,M,P,S,T,Y,V.



## 二、提高纯度和载量

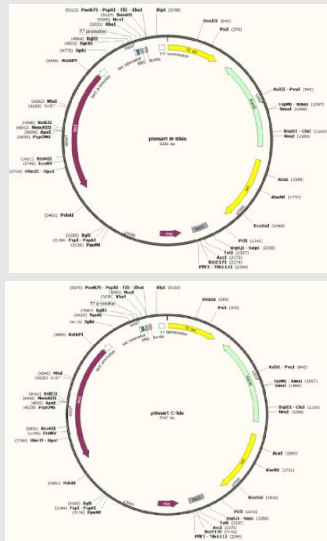
目的蛋白结合力、纯度：10×His > 8×His > 6×His



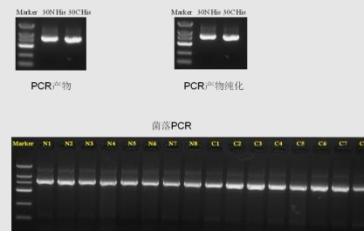
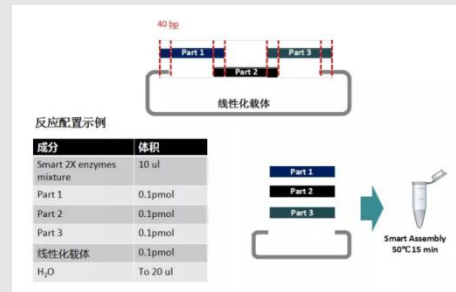
**Ni Smart Beads 6FF**

# 三、高纯度His标签蛋白表达纯化试剂盒

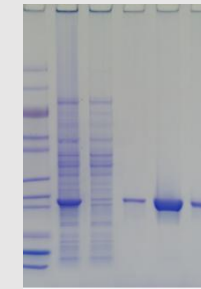
## 表达载体



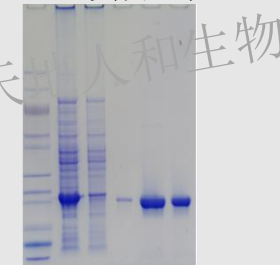
**pSmart N/C 8His载体 (原核)**  
5次



**Smart Assembly Cloning Kit**  
5次



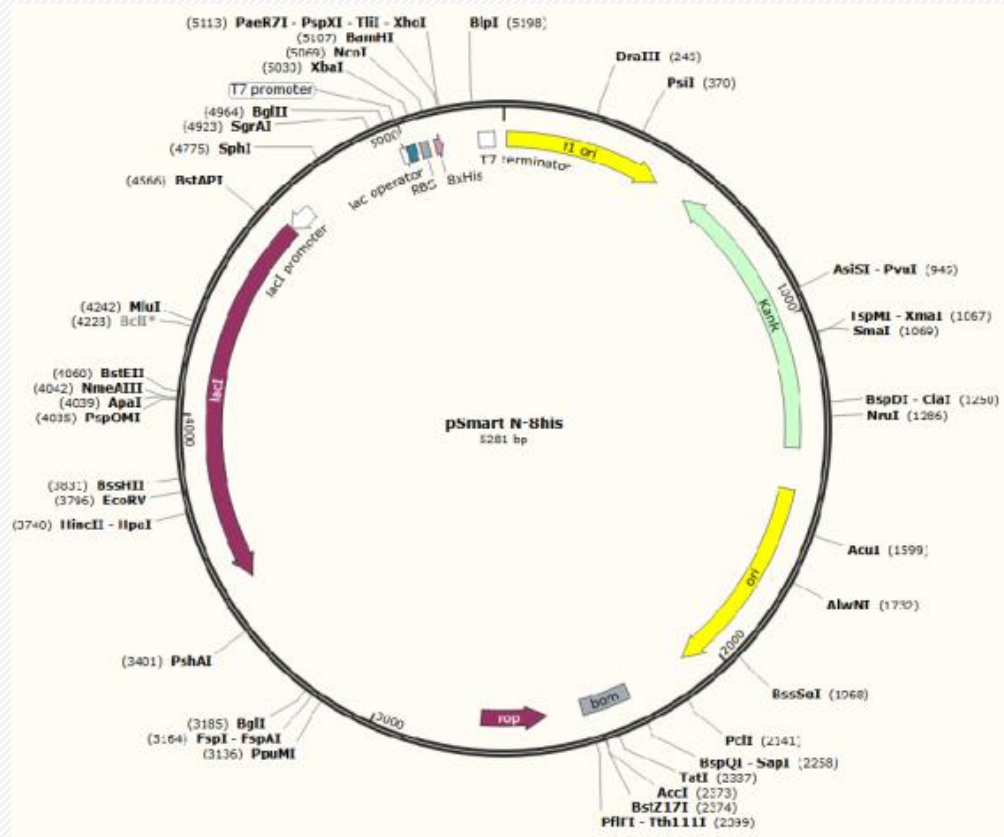
N-8His蛋白纯化



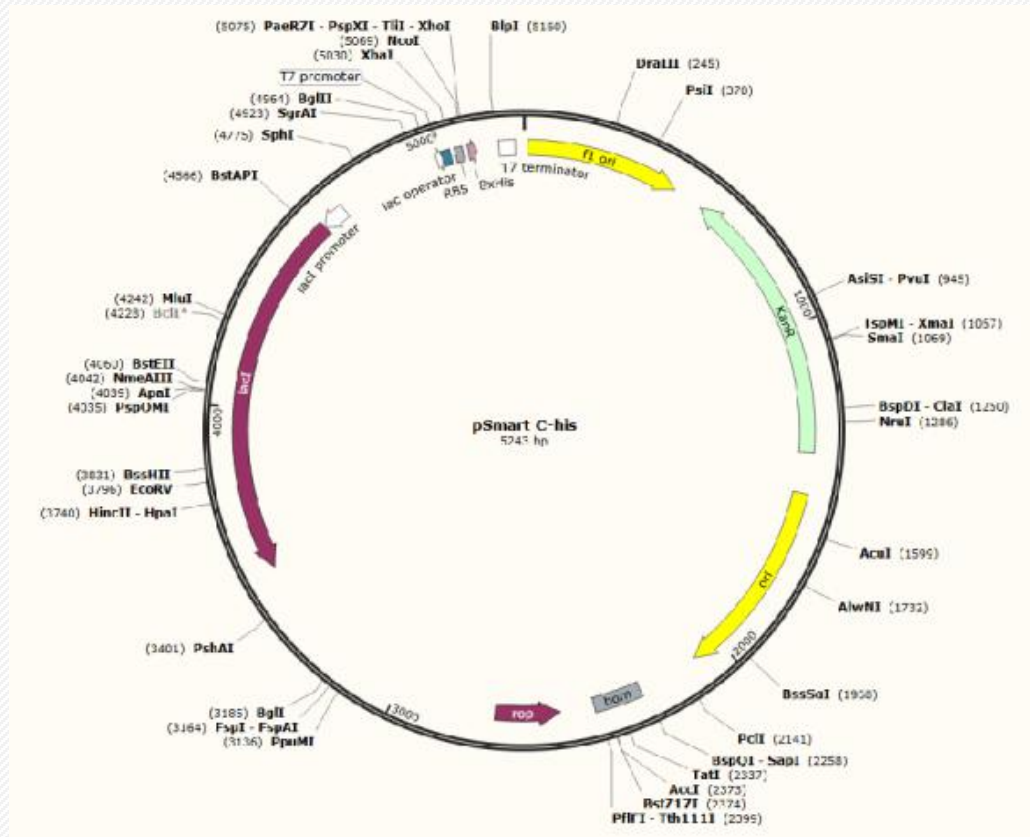
C-8His蛋白纯化

**Ni Smart Beads 6FF**  
10ml/预装柱

# 三、高纯度His标签蛋白表达纯化试剂盒



pSmart N 8His载体



pSmart C 8His载体

## 三、高纯度His标签蛋白表达纯化试剂盒

### Benzonase Nuclease

#### 应用

- 蛋白提取时去除核酸污染，降低样本粘度有利于纯化和检测，提高蛋白质产量；
- 有效减少存放的外周血单细胞的结块现象；
- 有利于不可溶性蛋白复性前，高质量包涵体制备；
- 有效去除带负电荷的核酸对双向电泳蛋白样品的影响；
- 可以用于IP， Co-IP， WB、免疫沉淀等实验，降低检测背景

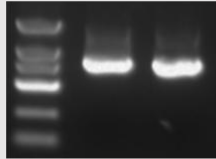
## 三、高纯度His标签蛋白表达纯化试剂盒

	超声法	DNase/RNase酶法	Benzonase全能核酸酶
相似处	可以破碎细胞或者组织	DNase酶消化DNA RNase酶消化RNA	Benzonase可以消化所有DNA和RNA
优势	利用剪切力可在一定程度上降解核酸	利用核酸内切酶活性，可在温和条件下，较好的消化核酸	一种酶即可降解所有形式的DNA和RNA，将DNA和RNA消化成3-8个碱基的单磷核苷酸； 可降低蛋白粘性、降低背景、提高蛋白产量； 目的蛋白被核酸包裹，只能使用benzonase将核酸消化，才能将蛋白释放； benzonase可以在低温下消化，不会降解目的蛋白； 极高的稳定性，可以与多种细胞细菌裂解液配合使用，去除粗提物中的核酸。
缺陷	1、超声只能打碎为大片段； 2、处理完样品很多还是很粘稠，不易吸取上样； 3、若目的蛋白被核酸包裹，无法使用超声方法； 4、即使在冰上操作，也会产热，易降解热敏感的蛋白； 5、机械操作随机性强，难评估核酸清除的有效性。	特定酶消化特定核酸，操作繁琐、重复性差	亲，还没发现呢^_^~^_^



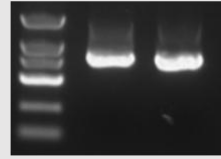
# 三、高纯度His标签蛋白表达纯化试剂盒

Marker 30NHis 30CHis



PCR产物

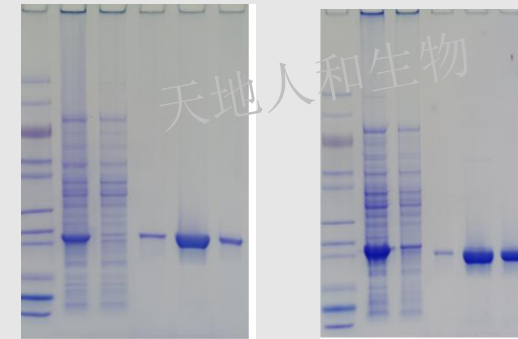
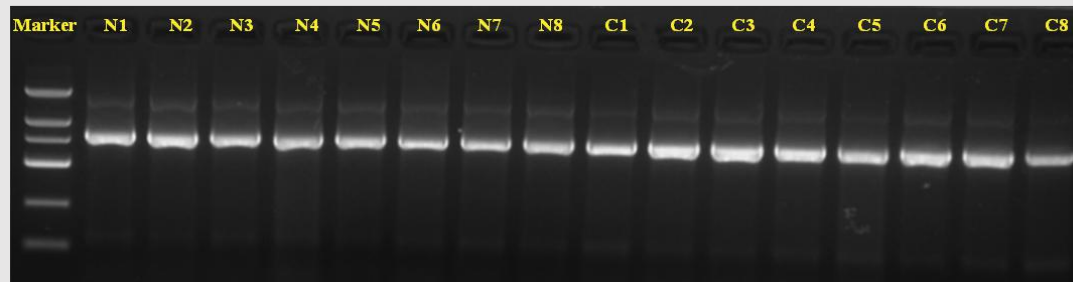
Marker 30NHis 30CHis



PCR产物纯化

纯度测试	咪唑浓度 (mM)	洗脱量 mg	回收量 (mg)
N端8×His	20	26.66	29.9
	150	3.28	
C端8×His	20	28	36
	150	8.16	

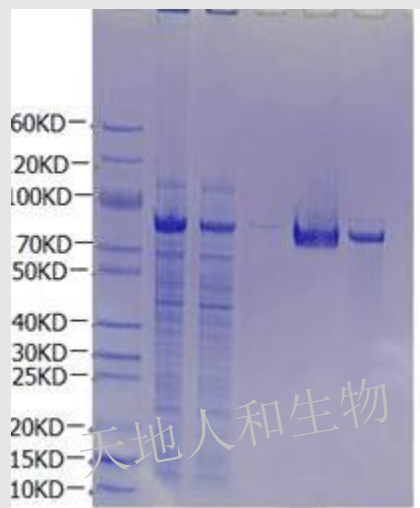
菌落PCR



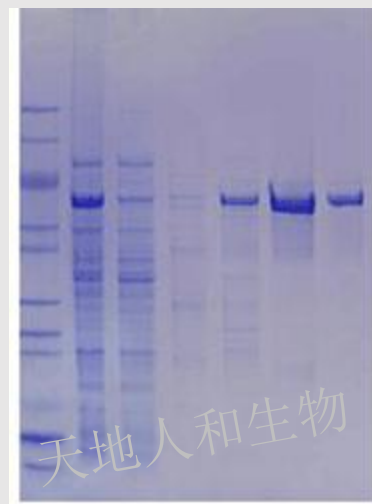
Ni Smart Beads 6FF

# 三、高纯度His标签蛋白表达纯化试剂盒

## 案例2、80Kd N-His标签蛋白纯化



Ni Smart Beads 6FF  
N-8 × His



Ni NTA Beads 6FF  
N-6 × His



Ni Smart Beads 6FF  
N-6 × His

填料	纯度测试	回收量 (mg)
Ni Smart Beads 6FF	N端8 × His	10.12
Ni NTA Beads 6FF	N端6 × His	8.52
Ni Smart Beads 6FF	N端6 × His	7.87



谢谢!



**SMART**  
LIFESCIENCES

