多聚组氨酸标签（His-tag）介绍及亲和层析原理

固定化金属离子亲合层析（Immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC），简称金属螯合亲合层析，是一种新型的应用于原核蛋白纯化的技术。该方法通过蛋白质表面的一些特殊的氨基酸，使之与金属离子发生相互作用，从而对蛋白质进行亲和纯化。这些作用包括配价键结合、静电吸附、共价键结合等，其中以 6 个组氨酸残基组合的融合标签（His-Tag）在原核蛋白表达中的应用最为显著。

His-Tag 可结合在目的蛋白的 C 末端或 N 末端，形成特殊的结构，以便于进行下一步的纯化及检测。由于金属螯合亲合层析具有配体简单、吸附量大、分离条件温和、通用性强等特点，所以可选择范围广，高盐，存在变性剂以及去垢剂的上样条件下进行纯化，His-Tag 正逐渐成为分离纯化蛋白质等生物工程产品最有效的技术之一。

His-tag 作为蛋白纯化时的首选标签，其优势在于：

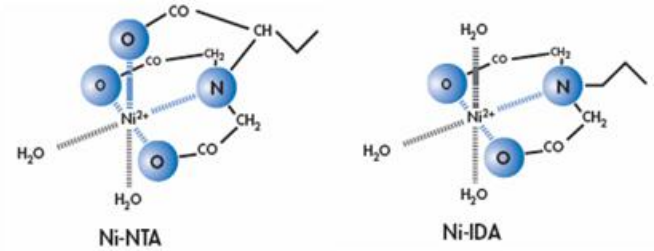
1. N-端的 His-Tag 与细菌的转录翻译机制兼容，有利于蛋白表达；
2. 采用 IMAC（固定化金属离子亲合层析）纯化 His-Tag 融合蛋白操作更加简便；
3. His-Tag 对目的蛋白本身特性几乎没有影响，不会改变目的蛋白本身的可溶性和生物学功能；
4. His-Tag 非常小，在融合蛋白结晶后对蛋白的结构没有影响；His-Tag 的免疫原性相对较低，可将纯化的蛋白直接注射入动物体内进行免疫并制备抗体；
5. 与其它亲和标签构建成双亲和标签，并可应用于多种表达系统；

His-Tag 融合蛋白的适用范围也较广，既可以在非离子型表面活性剂存在的条件下纯化，也可以在变性条件下进行纯化。前者通常用来纯化疏水性强的目的蛋白，而后者则通常纯化包涵体蛋白。

His-Tag 亲和层析填料

His-Tag 可与多种金属离子发生特殊的相互作用，如 Ca2+、Mg2+、Ni2+、Cu2+，Fe3+等，其原理是利用蛋白质表面的特性，使之被吸附在凝胶柱上，从而达到分离纯化蛋白的目的。

Ni2+在亲和纯化实验中的使用最为广泛。根据结合基团的不同，Ni2+亲和层析柱可分为俩类——Ni-IDA 和 Ni-NTA。Ni2+有六个螯合价位，其中 Ni-IDA 螯合了三价，Ni-NTA 螯合了四价。所以 IDA 的载量要比 NTA 的高，在同样条件下 Ni-IDA 洗脱时的咪唑浓度也高于 Ni-NTA。但其弱的结合力使金属离子在洗脱阶段时很容易浸出，与目的蛋白紧密结合，从而导致分离蛋白产量偏低，产品不纯及金属离子污染等问题。而 NTA 的颗粒粒度均匀，粒径更小，并且螯合镍更稳定，能耐受较高的还原剂，使填料更加稳定，镍离子不易脱落。



IMAC 在通常的情况下是比较稳定的，但螯合剂的存在则会导致其金属离子脱落。例如在 E.coli 的裂解液中普遍存在一些非特异的弱螯合剂，如在三羧酸循环中产生了二羧酸类物质。因此，E.coli 在某些高压情况下就会产生高特异性的金属螯合剂（通常存在于细菌的细胞周质中），导致 His-Tag 融合蛋白纯化的纯度和产量大大降低。所以在进行纯化 His-Tag 融合蛋白的实验时，首先需要去除螯合剂。

Ni-NTA 亲和层析实验

Ni-NTA 分离带 His 标签的重组蛋白

1. Ni-NTA 装柱，1.6×20cm，柱床体积为 10mL；
2. 用缓冲液 1 平衡 2~5 个床体积，流速为 2mL/min；
3. 将 20mL 细胞破碎液（50mM PBS，pH7.4，0.5M NaCl）0.45μm 滤膜过滤，上样，流速为 1mL/min；
4. 用缓冲液 1 再洗 2~5 个床体积，流速为 2mL/min；
5. 用分别含 10、20、50、100、200、300、400mM 咪唑的缓冲液 3 进行阶段洗脱，流速为 2mL/min，收集各阶段洗脱峰，用 SDS-PAGE 检测融合蛋白的分子量大小和纯度；
6. 用纯水流洗 5 个柱床体积，再用 20%的乙醇流洗 3 个柱床体积，流速为 2mL/min，柱子置于低温环境中保存。

缓冲液组成：

缓冲液 1

50mM pH7.4 的 PBS 缓冲液。配制：0.5M NaH_2PO_4 19mL，0.5M Na_2HPO_4 81mL，NaCl 29.3g，加适量水溶解后定容到 1000mL。

缓冲液 2

50mM 磷酸盐缓冲液，pH7.4，即 pH7.4 的 PBS 溶液。配制：0.5M NaH_2PO_4 19mL，0.5M Na_2HPO_4 81mL，NaCl 29.3g 和咪唑 34g, 加适量水，调 pH 后定容到 1000mL。

缓冲液 3

不同咪唑浓度的缓冲液 B 配制：

咪唑浓度	缓冲液 1 量（mL）	缓冲液 2 量（mL）
10mM	98	2
50mM	90	10
100mM	80	20
200mM	60	40
300mM	40	60

400mM	20	80

咪唑洗脱原理

Ni 柱中的氯化镍可以与有 His-Tag 的融合蛋白结合，也可以与咪唑进行结合，当标签蛋白与层析柱表面珠孔内的镍离子介质发生结合时，不同浓度的咪唑通过层析柱，就会将与镍配位的标签蛋白，杂蛋白等分别洗脱下来，从而得到高纯度目标蛋白。

附录：Ni-IDA 和 Ni-NTA 的一些参数对比

名称	Ni-IDA	Ni-NTA
参数	指标	
基质	6%交联琼脂糖凝胶	
配基	亚胺二乙酸（IDA）	次氮基三乙酸（NTA）
粒径	45~165 μm	60~169 μm
金属离子密度	40 μmol/mL	20-40 μmol/mL
载量	25-30mg 蛋白/mL	15mg 蛋白/mL
柱体积	1mL 或 5mL	1mL 或 5mL
柱尺寸 （内径 x 高度）	0.9x1.57cm（1mL 柱子） 0.9x1.57cm（5mL 柱子）	0.6cmx2.8cm（1mL 柱子） 1.4cmx2.98cm（5mL 柱子）
推荐流速	1mL/min（1mL 柱子） 5mL/min（5mL 柱子）	
最高流速	4mL/min（1mL 柱子） 10mL/min（1mL 柱子）	20mL/min（5mL 柱子） 40mL/min（5mL 柱子）
最高耐压	0.3MPa（3bar）	0.5MPa（5bar）
避免使用的试剂	螯合剂：EDTA、EGTA、柠檬酸等	>20mM 硫化试剂 >10mM DTT 螯合剂：EDTA、EGTA 阴离子去污剂
pH 稳定性	PH 2-14（短期，2h）；PH 3-12（长期，7 天）	

德泰生物产品推荐

标签抗体

货号	产品名称	浓度	规格
DTH01	HIS标签抗体	0.5mg/mL;1mg/mL	100μg
			500μg
			1mg
			5mg
			10mg
DTF01	Flag标签抗体	0.5mg/mL;1mg/mL	100μg
			500μg
			1mg
			5mg
			10mg
DTG01	GST标签抗体	0.5mg/mL;1mg/mL	100μg
			500μg
			1mg
			5mg
			10mg
DTM01	MYC标签抗体	0.5mg/mL;1mg/mL	100μg
			500μg
			1mg
			5mg
			10mg

试剂盒

货号	产品名称	组成	规格
DTT01	His标签蛋白快速检测试剂盒	His标签蛋白快速检测试纸条	10条
		样本稀释液	10mL