

## 亲和纯化常见问题分析解决

### 1. 通过 His 标签纯化的蛋白，杂带比较多，如何改进？

- (1) 如果纯化的是上清，蛋白酶会部分降解目的蛋白，可通过加多种蛋白酶抑制剂改进。
- (2) 可提高杂蛋白与镍柱结合起始咪唑浓度，以降低杂蛋白与镍柱的亲和力。
- (3) 杂蛋白和目的蛋白结合，可通过超声前加入去垢剂的方式消除（1%-2% Tritonx-100）。

### 2. 镍柱使用中出现棕色是怎么回事？

出现这样的情况，主要是缓冲液中 DTT 的影响，DTT 会对镍柱的颜色和纯化效率有很大的影响，在碱性的缓冲液条件下镍离子会被 DTT 还原生成棕色的沉淀，所以所有镍柱的生产商都强调要尽量避免 DTT 的参与（一般的镍柱耐受小于 5mM DTT，推荐缓冲液中不要超 2mM DTT）。

### 3. 镍柱堵了怎么办？

- (1) 柱子发生堵塞，可能是样品中细胞碎片或其他杂颗粒所致，所以样品一定要高速离心。
- (2) 上清纯化时，蛋白发生变性，有絮状物产生，赶紧加入 1-2mM DTT（上清样品处理要在冰浴中进行），还不行加尿素变性，使其在变形环境下。
- (3) 样品处理时的料液比不要太小，否则黏度大，或者导致蛋白析出或变性，料液比要在 1/10-1/15 之间较适宜。

### 4. 纯化过程中，蛋白出现了浑浊，怎么办？

- (1) 出现浑浊，说明蛋白处在不稳定的环境中或者自身就不稳定，所以要检查缓冲体系是否正确，环境是否低温，或在缓冲液中加入还原剂 DTT。
- (2) 加入肌氨酸钠，迅速使蛋白变性，消除浑浊现象。

### 5. 没能纯化到带 His 标签的蛋白，蛋白都流穿了（未挂柱）？

- (1) 超声的功率不对（太大，蛋白炭化，太小，蛋白没有释放）；
  - 策略：改变超声功率，并在超声前加入溶菌酶。
- (2) 样品或者是结合缓冲液不正确；
  - 策略：检测 pH 及样品和结合缓冲液的组成份（EDTA）。
- (3) 组氨酸的标签没有完全的暴露；
  - 策略：在变性条件下（用 8M 脲，6M 盐酸胍，1% SDS）并加入 1-2mM DTT 进行纯化。

(4) His 标签丢失；

- 策略 1：WB 或者 anti-his 的抗体检查 His 是否表达，上游构建，改变 his-tag 的位（C-terminal or N-terminal），必要时增加 his 个数（常用 6-10 个）；
- 策略 2：孵育的时间不够，降低流速和增加孵育的时间；
- 策略 3：改变螯合的金属离子，寻找到最佳的结合金属离子。

$Ni^{2+}$  通常是从宿主细胞蛋白中纯化大多数（组氨酸）<sub>6</sub> 标记的重组蛋白质的首选金属离子，也是一般最常用的离子。蛋白和金属离子之间的结合强度受几种因素影响，包括长度、位置、亲和标记在蛋白的暴露程度、所用离子的类型、以及缓冲液的 pH，因此一些蛋白用其他离子可能更容易地进行纯化而不用  $Ni^{2+}$ 。可以利用 Hitrap IMACHP 来筛选不同的金属离子。

## 6. 蛋白挂在柱子上洗脱不下来，怎么解决？

(1) 洗脱条件太温和（组氨酸标记的蛋白质仍然结合在柱上，结合力较强）策略：用增加咪唑的梯度洗脱或降低 pH 来找出最佳的洗脱条件。

(2) 降低 PH 的方法洗脱的，因为若 PH 低于 3.5，会导致镍离子脱落策略：改变洗脱办法，咪唑竞争性洗脱。

(3) 蛋白已沉淀在柱上策略：减少上样量和孵育的时间，试用去污剂（1%-2% Tritonx-100）或改变 NaCl 的浓度，或在变性条件下洗脱（用 8M 脲，或 6M 盐酸胍），最终也可在洗脱 Buffer 中加入 2mM DTT 或者 0.5% 肌氨酸钠进行洗脱。

(4) 非特异性疏水或其他相互反应策略：加非离子去污剂到洗脱缓冲液（如，2% Triton X-100）或增加 NaCl 的浓度。

## 7. 如何处理样品，可使其初步提纯（如何洗去蛋白的自身带）？

(1) 上清样品处理，要加入去污剂，蛋白酶抑制剂，还原剂，还要注意温度及超声破碎的参数。

(2) 去大肠杆菌自身带（两条 30KD-40KD）可用非变性缓冲液超声悬浮（加入去垢剂），离心 6000r/min，30min，10°C。（若效果不够可继续上述步骤）。

(3) 大肠杆菌包涵体的洗涤，可用包涵体洗液多洗几遍，也可用 1M/2M/4M/8M 尿素逐步溶解，可选取其中纯度最佳的。

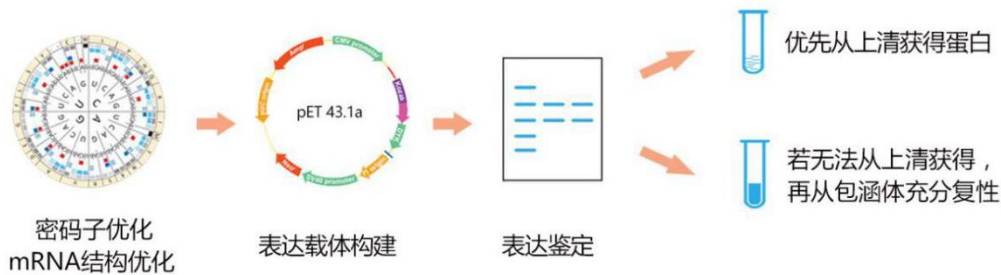
(4) 可用硫酸铵沉淀法，初步提纯。

## 南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

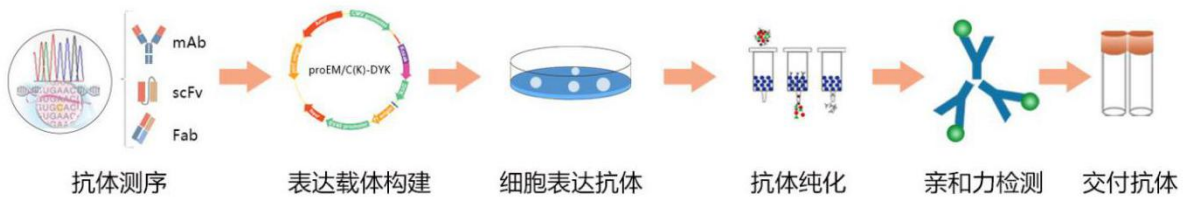
### 一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



### 二、蛋白表达（大肠杆菌表达）成功率>95%，不成功不收费，成功有保障



### 三、重组抗体表达 若想改造一个抗体，可以试试重组表达



### 四、稳定细胞系构建 研究级细胞系构建 & 高表达细胞株开发

