

HIS 包涵体纯化过程

1 试剂和耗材

TOP10 菌株 (Zoonbio 保种)

BL21(DE)3Plyss™ 表达菌 (Zoonbio 保种)

Protein Marker (购自 Thermo 公司)

IPTG、Acr、Bis、Tris (购自 Sigma 公司)

SDS (购自 Amresco 公司)

TEMED (购自 BIO-RAD 公司)

Tryptone、Yeast Extract (购自 OXOID 公司)

0.22 μm 无菌滤器和透析袋 (购自 Millipore 公司)

Ni-IDA 亲和层析胶 (购自 Novagen 公司)

其它试剂均为国产分析纯

2 主要实验仪器

Allegra 21R 台式高速冷冻离心机 (美国 BECKMAN 公司)

台式高速离心机 (德国 SORVAL 公司)

Mini Protean II 垂直平板电泳系统、GeL Doc2000 成像系统 (美国 BIO-RAD 公司)

320-S pH 计 (美国 MettLer ToLedo 公司)

雪花状制冰机 (日本 SANYO 公司)

JY92-2D 超声波细胞粉碎机 (中国新芝科器研究所)

超净工作台 (中国苏净集团)

3 实验方法

3.1.1 重组质粒载体转化至大肠杆菌 Arctic Express

- (1) 将质粒 1 μL 加入 100 μL 感受态细菌中，置冰上 20 min。
- (2) 42℃ 热激 90 sec，迅速置冰中 5 min，加入 600 μL LB 培养液。
- (3) 37℃，220 r/min 振摇 1 h，离心后全部涂布于含 50 μg/mL Amp 或 Kan 的 LB 平板，37℃ 倒置培养过夜。

3.1.2 IPTG 诱导重组菌融合蛋白的表达

- (1) 挑取转化平板上的单克隆接种于含 50 $\mu\text{g/mL}$ Amp 或 Kan 的 3 mL LB 培养液的试管中，37 $^{\circ}\text{C}$ 220 r/min 振摇过夜。
- (2) 次日按 1:100 接种于 50 $\mu\text{g/mL}$ Amp 或 Kan 的 30 mL LB 培养液中，37 $^{\circ}\text{C}$ 220 r/min 振摇至菌体 OD₆₀₀ 为 0.6-0.8。
- (3) 取出 1 mL 培养物，10000 r/min 室温离心 2 min，弃上清，用 100 μL 1 $\times$ 上样缓冲液重悬菌体沉淀。
- (4) a.向剩余的培养物中加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mM，37 $^{\circ}\text{C}$ 220 r/min 振摇 4 h，诱导融合蛋白表达。
b.向剩余的培养物中加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mM，11 $^{\circ}\text{C}$ 220 r/min 振摇过夜，诱导融合蛋白表达。
- (5) 取出 1 mL 培养物，10000 r/min 室温离心 2 min，弃上清，用 100 μL 1 $\times$ 上样缓冲液重悬菌体沉淀。剩余培养物 4000 r/min，离心 10 min，弃上清，用 PBS 重悬菌体沉淀；重悬液进行超声波破碎后，分别取上清液与沉淀液加入上样缓冲液重悬。
- (6) 进行 12% SDS-PAGE 检测分析，考马斯亮蓝染色显带。

3.2 包涵体蛋白的变复性

- (1) 将菌体沉淀重悬于 20 mL 裂解液(20 mM Tris-HCl containing 1 mM PMSF and bacteria protease inhibitor cocktail, pH 8.0)，超声破碎(功率 400 W，工作 4 sec，间歇 8 sec，共 20 min)。
- (2) 将超声破碎的细胞裂解液 4 $^{\circ}\text{C}$ 10000 r/min 离心 20 min，收集沉淀。
- (3) 使用包涵体洗涤液(20 mM Tris, 1 mM EDTA, 2 M 尿素, 1 M NaCl, 1% Triton X-100, pH 8.0) 洗涤包涵体 3 次。
- (4) 用溶解缓冲液(20 mM Tris, 5 mM DTT, 8 M 尿素, pH 8.0)，按一定比例溶解包涵体，4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜；室温，10000 r/min 离心 15 min。
- (5) 将上述溶液滴加 20 mM Tris-HCl，0.15 M NaCl, pH 8.0 缓冲液中，逐步成倍梯度稀释缓慢搅拌，将蛋白溶液装入透析袋于 20 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 8.0 溶液中透析过夜。

3.3 融合蛋白的 Ni 柱亲和纯化及结果分析

- (1) 利用低压层析系统，上清溶液以 0.5 mL/min 流速上样至 Ni-IDA Binding-Buffer 预平衡的 Ni-IDA-Sepharose Cl-6B 亲和层析柱。
- (2) 用 Ni-IDA Binding-Buffer 以 0.5 mL/min 流速冲洗，至流出液 OD₂₈₀ 值到达基线。
- (3) 用 Ni-IDA Washing-Buffer (20 mM Tris-HCl, 20 mM 咪唑, 0.15 M NaCl, pH 8.0) 以 1 mL/min 流速冲洗，至流出液 OD₂₈₀ 值到达基线。
- (4) 用 Ni-IDA Elution-Buffer (20 mM Tris-HCl, 250 mM 咪唑, 0.15 M NaCl, pH 8.0) 以 1 mL/min 流速洗脱目的蛋白，收集流出液。
- (5) 上述收集的蛋白溶液加入透析袋中，使用 PBS 进行透析过夜。
- (6) 进行 12% SDS-PAGE 分析。