integrated micro-chromatography systems

APPLICATION NOTE

# 基于 Analytik Jena CyBio Felix 平台实现 His 标签蛋白的高通量纯化与脱盐

Sinaa' Rogers, Patrick A. Kates, Nolan Foreman, L. Andrew Lee
*Integrated Micro-Chromatography Systems, Inc., Irmo, SC 29063*

## 概述

制备可立即用于检测的蛋白质依赖于两个关键步骤：从复杂的初始原料中分离出目标蛋白，并确保纯化后的蛋白质处于适宜的缓冲体系中。本文介绍了一种针对 $His_6$ 标签蛋白的高通量纯化与缓冲液置换流程。

使用 Analytik Jena CyBio FeliX 平台，依次采用 Ni-IMAC IMCStips ® 与 $SizeX_{150}$ IMCStips®，成功从细菌裂解液中分离出 $His_6$ 标签 GFP 蛋白。亲和纯化步骤实现超过 80% 的回收率和 95% 以上的纯度；经 SizeX 缓冲液置换后，小分子污染物的去除率超过 96%。这一高效流程为下游应用所需的蛋白质制备提供了重复性高且稳定的途径，显著减少了传统手动操作中常见的变异性和人力消耗。

## 方法优势

- 在 Analytik Jena CyBio FeliX 平台上使用 IMCStips 实现自动化，可在不同样品浓度与体积条件下保持稳定的蛋白质纯化与缓冲液置换效果
- 高回收率：蛋白质回收率超过 80%，稀释率极低（<20%），并能有效去除如咪唑等小分子污染物
- 支持多达 96 个样本的自动化批量平行处理，最大限度地减少手动操作时间并提升实验可靠性

## 引言

为适应日益加速的药物研发市场需求，开发更快速、更高效的蛋白质纯化方法势在必行。在生物治疗领域中，蛋白质既是重要的靶点，也是潜在的治疗药物和信号分子。固定化金属亲和层析（IMAC）技术——尤其是采用镍基填料的方法——是制备下游应用蛋白质的常用技术。尽管该方法十分高效，但其主要洗脱剂咪唑已被证实会干扰多种蛋白质检测。因此，缓冲液置换与小分子去除成为蛋白质样品制备、用于筛选及下游应用的关键步骤。

为突破这些局限，我们基于 Analytik Jena CyBio FeliX 平台建立了自动化工作流程：采用 Ni-IMAC IMCStips® 捕获 $His_6$ 标签蛋白，并通过 $SizeX_{150}$ IMCStips® 实现快速缓冲液置换。实验中采用 10、25 及50 µL 不同体积的树脂床对 $His_6$-GFP 进行纯化，使用户能根据自身蛋白滴度与应用需求选择最具成本效益的方案。通过加标溶液结合实验，为终端用户提供了定制化方法优化的参考依据。随后从细菌裂解液中纯化目标蛋白，并利用 $SizeX_{150}$ IMCStips® 完成缓冲液置换。HPLC-UV 分析验证了小分子去除效率超过 96%，证实了该方法对于下游应用的适用性。

## 结果

### 结合性能分析

使用树脂床体积分别为 10、25 和 50 µL 的 Ni-IMAC IMCStips® 对纯化的 $His_6$-GFP 进行了结合特性分析。针对三种规格的枪头，评估了 0.3~3.8 mg/mL 浓度范围的样品。通过固定循环次数进行 825 µL 样本的吸液-分液操作，采用差值计算法测定溶液中残留蛋白量。图1 展示了不同树脂用量对应的双相结合曲线拟合数据，相同数据在图2 中采用Langmuir 等温线拟合，并据此计算出各组枪头的最大结合容量（$q_{max}$）与解离常数（$K_D$）（表1）。

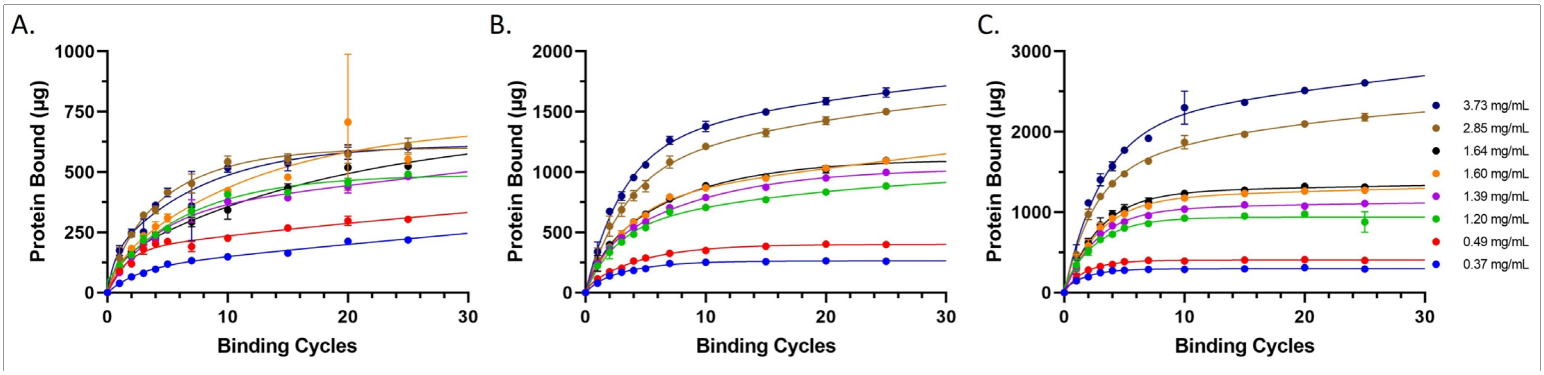



图1. His标签蛋白在Ni-IMAC IMCStips®上的结合特性曲线

展示了 $His_6$-GFP 在树脂床体积分别为（A）10 µL、（B）25 µL和（C）50 µL的 Ni-IMAC IMCStips®上（浓度范围 0.37–3.73 mg/mL）的代表性结合曲线。数据点为实验测定值，实线为拟合结合曲线。图中以结合 GFP 量对应循环次数作图，显示树脂容量逐渐达到饱和。数据点代表结合蛋白量的平均值（n=3），误差线表示标准差。

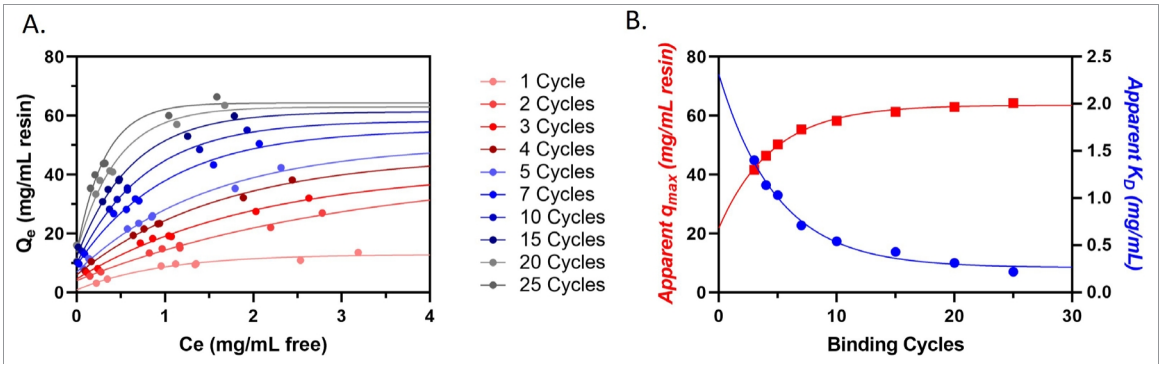



图2. 结合实验的 Langmuir 等温线分析

(A) Langmuir 等温线图展示了 25 µL 树脂床在 0-25 个结合循环中，GFP 平衡结合量（$Q_e$）与游离蛋白浓度（$C_e$）的函数关系。(B) 将每个循环次数对应的 $Q_e$ 与 $K_D$ 值作图并进行曲线拟合，以计算平衡状态下的最大结合容量（$q_{max}$）与解离常数（$K_D$）（详见表1）。

表1. Ni-IMAC IMCStips®的结合容量与解离常数

由 GFP 结合数据（至多 25 个循环）的 Langmuir 等温线拟合确定的最大结合容量（$q_{max}$）与平衡解离常数（$K_D$）值。

| Resin Volume (µL) | Apparent $q_{max}$ (mg/mL resin) | Apparent $K_D$ (mg/mL free protein) |
|---|---|---|
| 10 | 58.1 | 0.10 |
| 25 | 63.6 | 0.27 |
| 50 | 48.9 | 0.36 |

## 亲和纯化

采用 B-PER™ 完全裂解方案制备 BL21(DE3) 细菌裂解液。将 $His_6$-GFP 以 0.20、0.40、0.80 及 1.5 mg/mL 浓度梯度加入裂解液中，并使用 25 µL Ni-IMAC IMCStips®进行三重重复纯化。如表2 所示，在浓度低于 1 mg/mL 时，25 µL 枪头的蛋白回收率均超过 80%。此外，1.5 mg/mL 浓度下的回收率为 68.2%，这与图1 结合实验中观察到的结合情况相符。通过 SDS-PAGE 分析检测纯化蛋白纯度，确认其纯度 >95%（图3）。结果表明，从IMCStips®收集的纯化蛋白兼具高纯度与可预测性。

表2. 经 $SizeX_{150}$ 缓冲液置换后的咪唑清除效果

| [Sample] (mg/mL) | Area (AU*min) | [Imidazole] (mM) | % Removal |
|---|---|---|---|
| 0.42 | 321.77 | 15.06 | 96.9 ± 0.2 |
| 0.46 | 326.38 | 15.28 | |
| 0.47 | 351.82 | 16.47 | |
| 0.90 | 331.60 | 15.52 | 97.1 ± 0.5 |
| 0.89 | 245.46 | 11.49 | |
| 0.81 | 342.56 | 16.04 | |
| 1.63 | 249.98 | 11.70 | 97.8 ± 0.1 |
| 1.69 | 221.46 | 10.37 | |
| 1.78 | 239.31 | 11.20 | |
| 2.52 | 249.93 | 11.70 | 98.0 ± 0.5 |
| 3.09 | 155.97 | 7.30 | |
| 3.22 | 231.71 | 10.85 | |

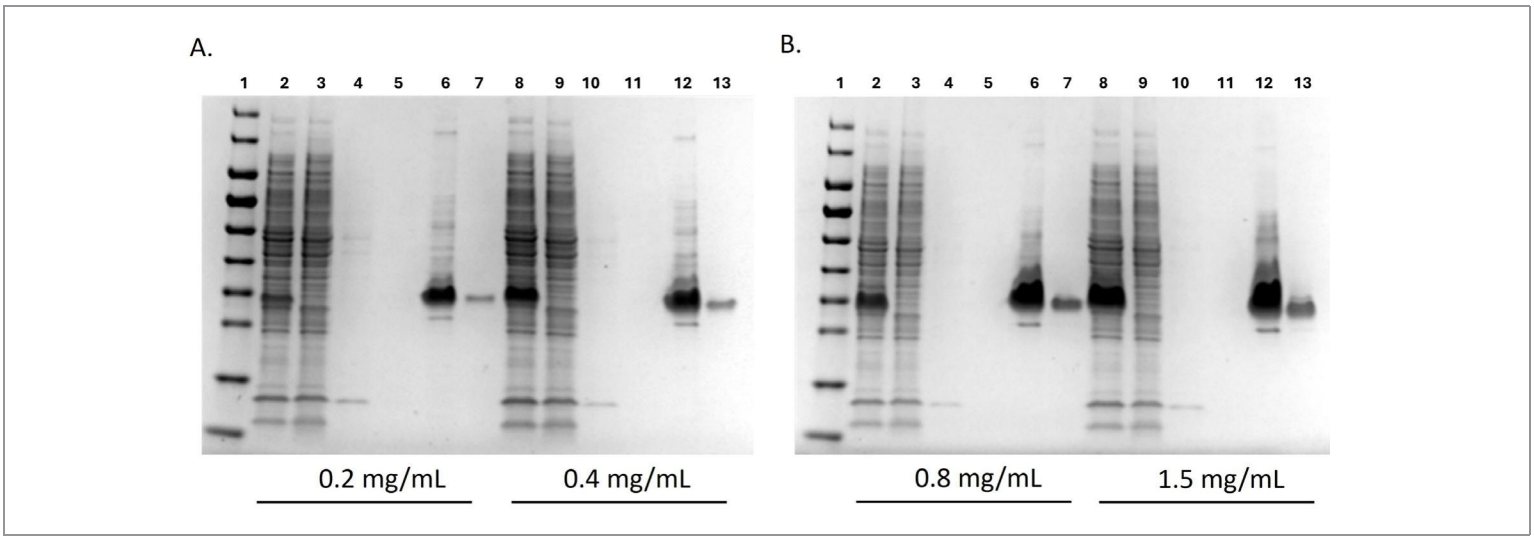



图3. 加标细菌裂解液中 $His_6$-GFP 的 SDS-PAGE 分析

**(A)** SDS-PAGE 凝胶电泳图显示：泳道(1) 蛋白分子量标准，(2) 0.2 mg/mL 加标样品原液，(3) 穿流液，(4~5) 洗涤液，(6~7) 洗脱液；(8) 0.4 mg/mL 加标样品原液，(9) 穿流液，(10~11) 洗涤液，(12~13) 洗脱液。
**(B)** SDS-PAGE 凝胶电泳图显示：泳道(1) 蛋白分子量标准，(2) 0.8 mg/mL 加标样品原液，(3) 穿流液，(4~5) 洗涤液，(6~7) 洗脱液；(8) 1.5 mg/mL 加标样品原液，(9) 穿流液，(10~11) 洗涤液，(12~13) 洗脱液。

## $SizeX_{150}$ 缓冲液置换

收集的 GFP 初次洗脱液（含 500 mM 咪唑）随后在 Analytik Jena CyBio FeliX 平台上，使用 $SizeX_{150}$ IMCStips® 进行三重重复的缓冲液置换至 1× PBS。蛋白质浓度范围为 0.56~3.99 mg/mL，平均洗脱回收率为 82.5 ± 3.1%，平均置换体积为 160 ± 1 µL（图4）。

为验证小分子污染物（此处以咪唑为例）的去除效果，在 $SizeX_{150}$ 缓冲液置换前后，通过 HPLC-UV 系统的尺寸排阻色谱柱对样品进行分析。利用 HPLC-UV 测定的咪唑浓度标准曲线，将峰面积转换为残余咪唑浓度。通过去除咪唑、还原剂或其他潜在污染物，并将蛋白质置换至目标 pH 值和盐浓度的缓冲体系中，使蛋白质样品可直接用于后续处理步骤。

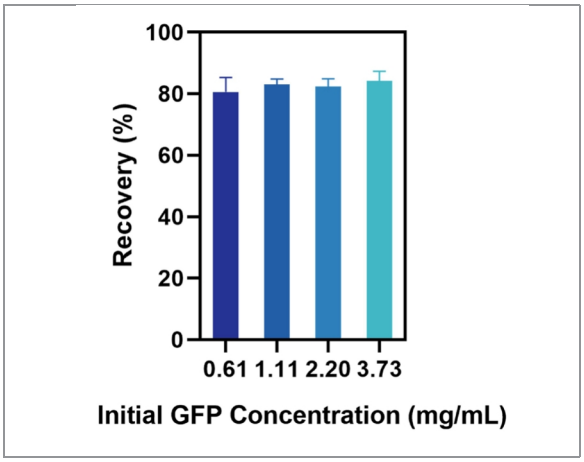



图4. $SizeX_{150}$ 缓冲液置换步骤后 $His_6$-GFP 的回收率。

初始浓度基于前序纯化洗出液的稀释梯度，范围 0.61-3.73 mg/mL。所有样品均在 Analytik Jena CyBio FeliX 平台上进行三重重复实验。柱状图显示均值±标准差（n = 3）。

## 结论

本研究成功将基于 IMCStips® 的自动化工作流程扩展至 Analytik Jena CyBio FeliX 平台，并展示了两种应用方案。第一套方案采用自动化镍基亲和纯化技术，为从溶液中纯化 His 标签蛋白提供了一种简便、高效且重复性优异的方法。第二套方案利用 $SizeX_{150}$ IMCStips®，建立了快速自动化的目标蛋白脱盐与缓冲液置换流程，实现了高回收率（>80%）、低稀释度（<20%）以及卓越的小分子去除效果（>96%）。此外，本方法支持并行处理 1-96 个样本，显著节约用户的操作时间，并减少人工干预需求。

## 材料与方法

### 化学品与试剂

Ni-IMAC IMCStips®（树脂床体积：10 µL（货号：02-TK-Y1 (R72-10-96)）、25 µL（货号：02-TK-Y1 (R72-25-96)）、50 µL（货号：02-TK-Y1 (R72-50-96)））以及 SizeX$_{150}$ IMCStips®（货号：02-TK-Y1 (R76-350-96)）均由 IMCS 公司（美国南卡罗来纳州 Irmo）提供。纯化 His$_6$-GFP 由 IMCS 通过传统柱层析法制备。

### 仪器设备

所有自动化操作均在配备 Head R 96/1000 µL 吸头的 Analytik Jena CyBio FeliX 平台上完成。蛋白浓度通过 NanoDrop™ 分光光度计（赛默飞世尔科技）测定。SDS-PAGE 使用Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra Cell 电泳系统（美国加利福尼亚州 Hercules）进行。小分子去除率通过配备 UV 检测器（214 nm）的Vanquish™ HPLC 系统（赛默飞世尔科技）定量分析。

### 结合动力学实验

使用纯化His$_6$-GFP（以 1× PBS 稀释至~4.0、3.0、2.0、1.5、1.25、1.0、0.5 及 0.25 mg/mL 浓度）测试 10、25、50 µL 树脂床体积的 Ni-IMAC IMCStips®。每个浓度与树脂体积组合均进行三重重复实验。每次运行时，取 800 µL 样本以 30 µL/s 速度吸入、10 µL/s 速度推出，循环 25 次通过树脂床，并于第 1、2、3、4、5、7、10、15、20、25 次循环后暂停进行蛋白定量。单次循环时间约 110 秒。结合蛋白量通过起始上样量差值计算获得。

### His 标签 GFP 纯化

通过推荐比例使用 B-PER™ 完全裂解液裂解 BL21(DE3) 细胞沉淀制备细菌裂解液。将纯化 His$_6$-GFP 加标至裂解液中，制备已知起始浓度（0.2-1.5 mg/mL）的样本。每个浓度使用 25 µL Ni-IMAC IMCStips® 进行三重重复纯化：先以1 × PBS 平衡枪头，取 1000 µL 样本进行 800 µL 吸入-推出循环；随后以 800 µL 1× PBS 洗涤两次，最后用 150 µL 洗脱缓冲液（20 mM 磷酸钠、500 mM NaCl、500 mM 咪唑，pH 7.4）进行两次洗脱。

### SizeX$_{150}$缓冲液置换

SizeX$_{150}$ IMCStips®使用前以 1× PBS 平衡。将细菌裂解液纯化所得样品稍作稀释作为置换前储备液，经平衡的枪头处理后以 1× PBS 洗脱。通过分光光度法（A280）测定洗脱液浓度以计算回收率，并制备 SDS-PAGE 样品。同时检测洗脱液中咪唑去除效果。

### 咪唑去除率检测

洗脱产物用 HPLC 流动相稀释四倍后上样至 HPLC-UV 系统。置换后咪唑浓度通过咪唑标准品校准曲线经 HPLC-UV 定量分析。

### HPLC-UV 分析

使用 Agilent AdvanceBio SEC 300Å 2.7 µm（7.8×300 mm）色谱柱，以 100 mM 磷酸钠（pH 7.0）为流动相（流速 1.0 mL/min）进行分析。通过 214 nm 紫外检测定量咪唑浓度。以咪唑标准品梯度稀释建立校准曲线，用于计算置换后样品浓度。通过比较置换后浓度与起始浓度（500 mM）计算去除率百分比。

无锡微色谱生物科技有限公司
地 址：江苏省江阴市月城镇北环路 19 号
电 话：17715681752
邮 箱：custserv@micro-sep.com
Web: www.micro-sep.com