

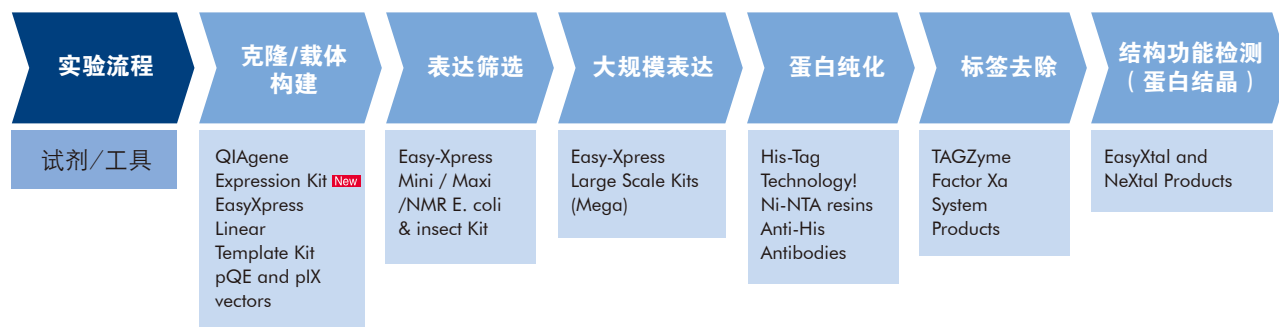
整合的蛋白质组解决方案 II

——从 6×His 标签蛋白表达纯化到结晶



Sample & Assay Technologies

针对功能蛋白质组学的研究，QIAGEN 提供完整的解决方案，从 6×His 标签蛋白的表达，纯化，检测，到蛋白晶体的培养，QIAGEN 提供全套产品。



本手册主要内容包括：

- 6×His 标签蛋白表达系统P2-P6
 - QIAGEN 预制蛋白载体 **New**
 - QIAGEN 表达载体结构
 - QIAGEN 表达载体有效提高蛋白产量
 - 利用 Ni-NTA 纯化 QIAGEN 蛋白
 - QIAGEN 蛋白载体订购
 - QIAXpress System 体内表达
 - EasyXpress System 体外表达
- 6×His 标签蛋白纯化系统P7-P11
 - Ni-NTA 纯化试剂特点
 - Ni-NTA 纯化 6xHis 标签蛋白的实验流程
 - Ni-NTA 纯化试剂结构
 - Ni-NTA 纯化试剂的兼容性
 - Ni-NTA 纯化试剂的结合能力
 - Ni-NTA 纯化 6×His 标签蛋白的纯度
 - Ni-NTA 纯化试剂规格及参数
- 6×His 标签去除系统P12
- 6×His 标签蛋白检测系统P12
- QIAGEN 蛋白结晶平台P13-P14
- 常见表达纯化问题及建议P15
- 产品订购信息P16-P17
- 最新文献摘选P18

6×His 标签蛋白表达系统

QIAGEN 的蛋白表达产品主要围绕 6×His 标签所设计。目前 QIAGEN 提供 QIAexpress System 体内表达和 EasyXpress 体外表达产品用于获得 6×His 标签蛋白。并开发了 QIAgene 预制蛋白表达载体，专门解决人类蛋白的表达难题。

相比于其他常用标签（如 GST），6×His 标签具有以下独特优势：

- 分子量小，只有 0.84 KDa
- 在 pH8.0 时不带电，几乎没有免疫原性
- 不会影响蛋白的分泌、折叠和功能
- 可以放在 C 端或 N 端
- 下游可以利用金标准 Ni-NTA 进行纯化

QIAgene 预制蛋白表达载体 **NEW**

QIAgene 预制蛋白表达载体是 QIAGEN 和 GENEART 合作推出，专门针对 35,000 个人类基因所设计，目的在于解决人类蛋白表达瓶颈难题。采用最权威的 Gene Optimizer™ 软件，对 DNA 序列进行以下方面优化：

- 消除稀有密码子而采用最佳密码子
- 调整编码序列 GC 含量
- 最小化 mRNA 二级结构影响
- 避免重复序列和内部核糖体结合位点等影响

经优化后的全长 cDNA 序列克隆到表达载体中，进一步经过序列验证，以确保序列的正确性。确保优化序列在 *E.coli* 体内或体外，昆虫细胞 (Coming soon)，哺乳动物细胞体系 (Coming soon) 中高效表达。

QIAgene Expression Kit 提供整套解决方案，包括 QIAgenes Expression Construct *E. coli*, Positive Control, Penta-His Antibody 以及 Ni-NTA Spin Columns。

QIAgene 表达载体结构

- 含有 T7 启动子，可直接在 BL21 (DE3) 等菌株或利用无细胞系统进行表达 (如 EasyXpress *E.coli*-based kits)
- N 端带有 6×His 标签，在 Ni-NTA 上进行一步亲和纯化，利用 TAGzyme™ 去除 6×His 标签
- His-tag 两端有 Nde I 酶切位点，可用于表达无标签蛋白
- C 端内置琥珀终止密码子，方便利用 EasyXpress Site-Specific Biotin Kit 进行生物素标记
- 卡那霉素抗性用于筛选

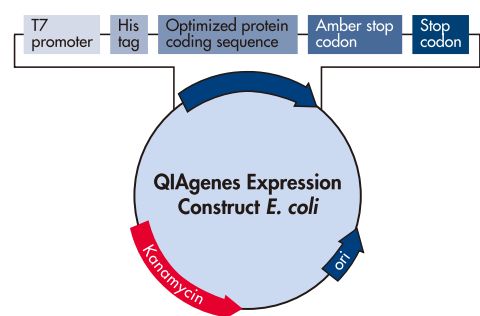


图1 QIAgenes表达载体结构

6×His 标签蛋白表达系统

QIAgene 表达载体有效提高蛋白产量

对表 1 中 100 种 DNA 序列优化前后的表达结果进行比较，结果表明，使用 QIAgene 大于 90% 的蛋白被成功表达（膜蛋白占 60%），产量比未经优化序列提高 50 倍。且无论在 *E.coli* 体内，体外系统中均能得到最优表达（见图 2）。

表 1 DNA 序列优化实验

Protein class	Number of proteins investigated
Kinases	15
Membrane proteins	30
Transcription factors	20
Ribosomal proteins	15
Cytokines	15
Others	5

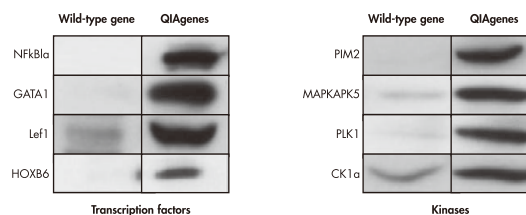


图 2 未优化序列与 QIAgene 优化序列表达水平比较。利用 EasyXpress 体外表达系统进行蛋白表达，Ni-NTA 纯化后，利用 Penta.His 抗体检测表达水平

利用 Ni-NTA 纯化 QIAgene 蛋白

QIAgene 表达载体 N 端带有 His 标签，可以利用 Ni-NTA 一步纯化得到高纯度蛋白。如果实验需要得到无标签蛋白，His 标签可以利用 TAGZyme system 去除（见图 3）。

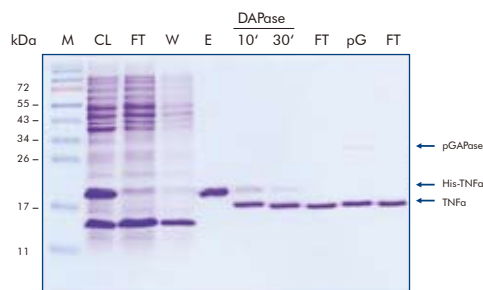


图 3 利用 TAGZyme 高效去除 His 标签。His-tagged TNFα 利用 Ni-NTA 纯化后，与 DAPase 孵育 30 min。M: 分子量标准 CL: 细胞裂解物 FT: 流出组分 W: 洗涤组分 E: 洗脱组分

QIAgene 表达载体订购

QIAgene 的订购也非常方便，点击 www.qiagen.com/PG/GeneGlobe/Default.aspx，输入所需基因即可。省去了传统流程中的文库筛选，PCR 扩增，亚克隆，克隆筛选，测序等繁琐步骤。

QIAgene 预制表达载体用来提高人类蛋白在 *E.coli* 中的表达成功率和产量，获得的蛋白可用于以下领域：

- 1) 功能分析
- 2) 结构分析
- 3) 相互作用检测

QIAexpress system 体内表达

QIAexpress System 体内表达产品用于蛋白的大量表达。QIAexpress 系列采用 pQE 载体在大肠杆菌，哺乳动物细胞以及杆状病毒中表达 6×His 标签蛋白。按照 6×His 标签加入的位置、种类可以将 pQE 载体分为以下几类：

- N 末端标签载体
- C 末端标签载体
- 顺式抑制表达载体
- 多系统表达载体
- 含有切除标签蛋白酶切位点载体
- 双标签载体, pQE 载体详情见表 2

体内表达实验流程

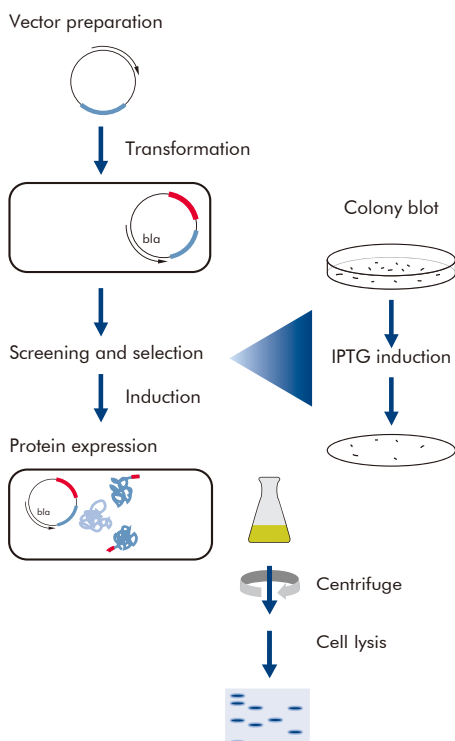


表 2 pQE 载体选择表

应用	载体
表达 N 端带有 6×His 标签的蛋白	
标准表达标签	pQE-9, -30, and -80L series
直接克隆 PCR 产物	pQE-30 UA
高效去除 6×His 标签	TAGZyme™ pQE vectors, pQE-30 Xa
毒性相关蛋白表达	pQE-80L series
双标签载体	pQE-100 DoubleTag™
小分子量蛋白和多肽表达	pQE-40
表达 C 端带有 6×His 标签的蛋白	
标准表达标签	pQE-60, -70
多系统表达载体, 平行在 <i>E. coli</i> , Insect 和 Mammalian 细胞中表达	pQE-TriSystem
表达带有 His·Strep-tagged 或 Strep-tagged 蛋白	pQE-TriSystem His·Strep 1 and 2
小分子量蛋白和多肽表达	pQE-16
表达 C 端带有 Strep 标签的蛋白	
标准表达标签	pQE-TriSystem Strep vector

QIAexpress System 体内表达产品获得的蛋白适用于多种应用，包括有：

- 1) 活性功能蛋白制备
- 2) 抗体制备
- 3) 结晶实验
- 4) 蛋白 - 蛋白和蛋白 - DNA 相互作用分析

EasyXpress System 体外表达

EasyXpress System 体外表达用于快速筛选和表达多种蛋白产物。体外表达产品线分为原核体外 (*E. coli*) 和真核体外 (Insect) 表达 (见表 3)。EasyXpress Protein Synthesis Kit 使用高质量的 *E. coli* 裂解液, 该种裂解液含有所有用于有效蛋白合成所需的转录和翻译机制的组分, 可以获得 600 µg/ml (Mini 和 Maxi kit) 或 5 mg/2×5 ml 的蛋白产量 (Mega 和 NMR Kit)。

体外表达实验流程

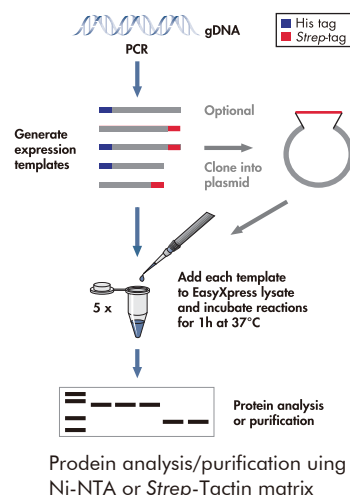


表 3 EasyXpress System 体外表达产品选择表

应用	产品
2-step PCR 制备线性模板	EasyXpress Linear Template Kit Plus
小到中量体外合成重组蛋白	EasyXpress Protein Synthesis Mini Kit EasyXpress Protein Synthesis Maxi Kit
对重组蛋白进行定点或随机性生物素标记	EasyXpress Site-Specific Biotin Kit EasyXpress Random Biotin Kit
大规模体外合成重组蛋白	EasyXpress Protein Synthesis Mega Kit EasyXpress NMR Protein Synthesis Kit
体外合成带有翻译后修饰的真核蛋白	EasyXpress Insect Kit II EasyXpress pIX4.0 Vector

真核体外表达产品 EasyXpress Insect II 采用优化的昆虫细胞裂解液与兔网织红细胞等体系不同, 无须添加其他成分就可以真正实现翻译后修饰蛋白的快速表达 (见图 4, 表 4), 已成功用于激酶、膜蛋白、糖蛋白、磷酸化蛋白等的体外表达 (见图 5、表 5)。

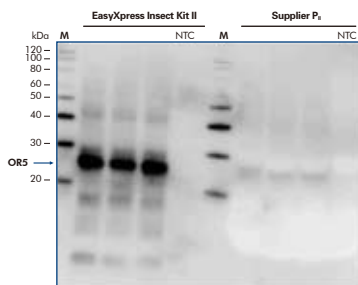


图 4 利用 EasyXpress Insect II Kit 与兔网织红细胞体系 (RRL-based kit) 表达膜蛋白 OR5 (odorant receptor 5) 对比图。NTC: 无模板对照, M: 分子量标准

表 4 昆虫细胞 (EasyXpress Insect) 体系与兔网织红细胞 (RRL-based) 体系对比

对比标准	EasyXpress Insect Kit II	RRL-based kit (Supplier P)
产量	40 μg/ml (全部活性蛋白)	3-6 μg/ml
翻译后修饰	糖基化, 信号肽剪切, 磷酸化	需要另外购买添加微粒体膜; 产量减少50-80%
重现性	好, 昆虫细胞系和裂解液的处理是连续的	差, 混合体系(兔网织红细胞和微粒体膜)来自不同的动物个体
裂解液中氨基酸浓度	固定浓度, 便于在放射性标记实验中计算产量	不同氨基酸浓度差异大(1 μM - 1 mM)
操作性	所有成分均为液体, 加样精确度高	裂解液含有红色沉淀物, 导致精确加样困难, 干扰光度检测

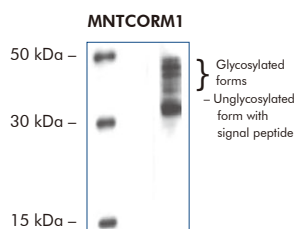


图5 EasyXpress Insect kit用于成功表达糖蛋白ORM1, 利用Penta His 抗体进行检测。NTC: 无模板对照, M: 6×His蛋白分子量标准

表 5 EasyXpress Insect kit 成功用于各类真核蛋白表达

蛋白种类	利用EasyXpress Insect System成功表达的蛋白
Kinases	PKACβ, IRAK4, AKT1, MKK3, pKAα
Membrane proteins	Mitochondrial 2-oxoglutarate carrier protein (OGCP), Mtj1, TrpV4, CNR1
Blood coagulation factors	Factor II, Factor VIII (B domain)
Transcription/translation factors	TFIIAαβ, TFIIAγ, eIF4E
Cytokines and growth factors	TNFα, TAU
Glycoproteins	EPO, alpha-1-acid glycoprotein 1 (ORM), gp67
Other enzymes	Luciferase, CAT, Isopentenyl-diphosphate delta-isomerase (IDI), β-glucuronidase, DHFR
Other proteins	GFP variants, FABP, Ubiquitin, Transthyretin

用 EasyXpress System 体外表达产品获得的蛋白适用于广泛的下游应用, 包括:

- 1) 活性分析
- 2) 结构和突变分析
- 3) 蛋白-蛋白相互作用研究
- 4) 开放阅读框的表达和分析

6×His 标签蛋白纯化系统

利用 QIAexpress System 体内或 EasyXpress 体外表达 6×His 标签蛋白后，要想获得目标蛋白必须利用 Ni-NTA 纯化试剂进行纯化，Ni-NTA 蛋白纯化试剂具有以下特点：

- 灵活性好 — 蛋白可在变性 / 非变性条件下进行纯化
- 独特的 Ni-NTA 结构 — 极低的 Ni 离子脱落率
- 兼容性好 — 可兼容各类变性剂，还原剂等（如可兼容 10 mM DTT）
- 纯度高 — 一步纯化即可以得到 95% 纯度的蛋白
- 结合能力强 — 蛋白结合量达到 20-40 mg/ml
- 产品规格多 — 可纯化 ng 级至 kg 级 6×His 标签蛋白

Ni-NTA 纯化 6×His 标签蛋白的实验流程

从 6×His 标签蛋白的纯化流程来看，首先镍离子被螯合到固相支持物共价结合的反应性基团上，当 6×His 标签蛋白溶液流经亲和和纯化介质时，蛋白被特异亲和吸附，洗掉杂质后再洗脱目标蛋白。在天然条件下利用 Ni-NTA 纯化 6×His 标签蛋白可以保持其天然结构和活性，获得的蛋白可直接用于功能检测。在变性条件下进行纯化，蛋白会丧失天然结构，获得的蛋白可以进行 Western blotting 分析和抗体制备，也可以通过复性以获得功能蛋白。

Ni-NTA 纯化试剂结构

QIAGEN 专利的 Ni-NTA 纯化填料为 4 价螯合，即镍离子通过 4 价键螯合在纯化树脂（填料）上，而 Ni-IDA 为 3 价螯合（见图 6）。对比数据表明，在各种纯化条件下，Ni-NTA 树脂的金属镍离子脱落率最低（见图 7）。

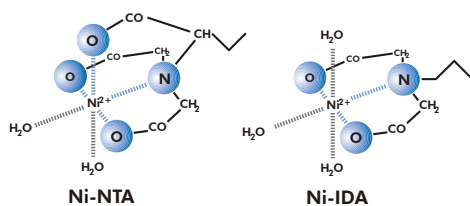


图 6 Ni-NTA 与 Ni-IDA 结构比较图。Ni-NTA 为 4 价螯合，Ni-IDA 为 3 价螯合。

Ni-NTA 纯化 6×His 标签蛋白的实验流程

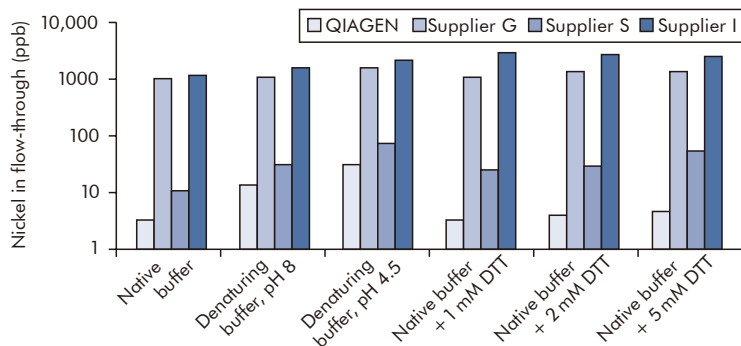
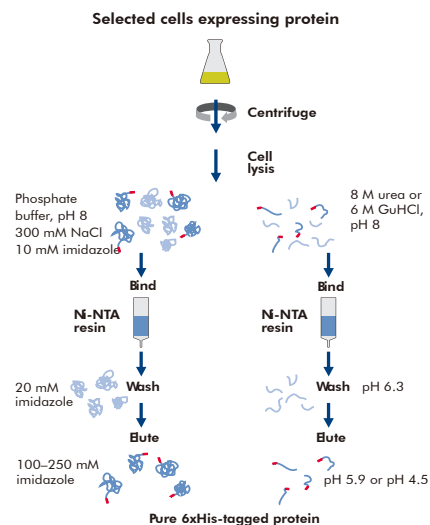


图 7 各种纯化试剂的金属镍脱落率比较图。实验测试结果表明，在各种纯化条件下（天然、变性以及不同浓度 DTT 存在时），QIAGEN 的 Ni-NTA 产品金属镍的脱落率最低。

Ni-NTA纯化试剂的兼容性

Ni-NTA 可以兼容各类变性剂，还原剂，去垢剂等。表 6 中列出了 Ni-NTA 可以兼容的各种常见试剂。值得一提的是在 10 mM DTT 的存在下利用 Ni-NTA 仍能纯化得到活性蛋白（见图 8）

表6 与Ni-NTA可以兼容的常见试剂

变性剂	去污剂	还原剂	其他	盐	长期保存
6 M Gu·HCl	2% Triton X-100	20 mM β -ME	50% glycerol	4 M MgCl ₂	Up to 30% ethanol
8 M Urea	2% Tween 20	10 mM DTT	20% ethanol	5 mM CaCl ₂	or 100 mM NaOH
	1% CHAPs		20 mM imidazole	2 M NaCl	

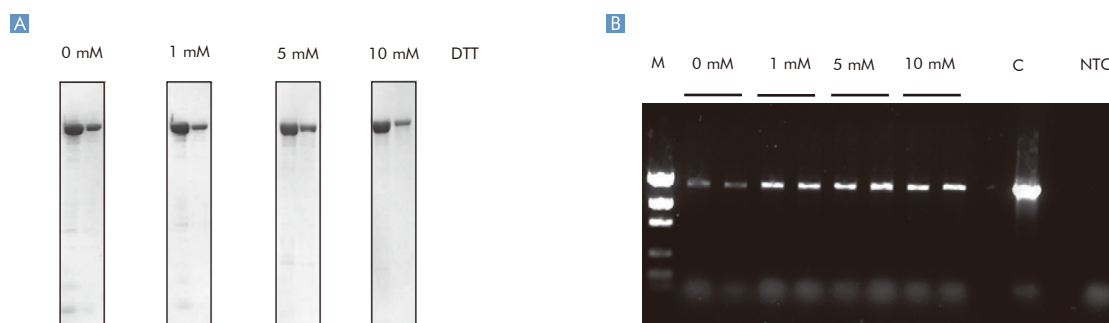


图 8 **A** 在不同浓度 DTT (0, 1, 5, 10 mM) 存在下, 利用 Ni-NTA 纯化 6×His-Tagged HIV reverse transcriptase。结果表明, 即使在 10 mM DTT 存在下仍能纯化得到活性蛋白。**B** 在不同浓度 DTT (0, 1, 5, 10 mM) 存在下, 检测 6×His-Tagged HIV reverse transcriptase 的表达水平

Ni-NTA 纯化试剂的结合能力

一般来讲, Ni-NTA 树脂的结合量为 20-40 mg/ml。由于 Ni-NTA 结合能力和蛋白的种类性质相关, 对于某些蛋白如 6His-GFP 的结合量甚至大于 55mg/ml (见图 9)。

表 7 Ni-NTA 产品对不同种类蛋白的结合量

6×His标签蛋白	纯化条件	结合量 /ml 树脂
hTNFα	Native	16.7
GFP	Native	25.4
CAT	Native	31.3
T7 RNA Polymerase	Native	33.3
GroES	Native	25.3
Pyroglutamyl aminopeptidase	Native	20.0
Thioredoxin	Denaturing	20.3
HIV Protease	Denaturing	20.2

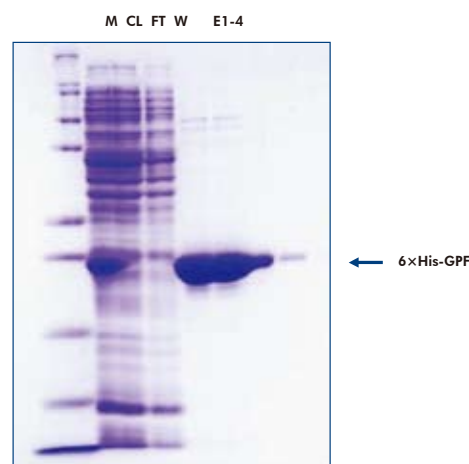


图 9 利用 Ni-NTA Superflow 预装柱 (1ml) 纯化 6×His-GFP 蛋白。Bradford 测试结果表明 6×His-GFP 的结合量为 55 mg/ml。

Ni-NTA纯化6×His标签蛋白的纯度

Ni-NTA 带来的高纯度蛋白基于两大技术优势：

- 对 Ni-NTA 与基质之间的结合距离进行优化，减少了非特异性蛋白的结合
- 独特的 4 价螯合最大程度防止镍离子的脱落，降低了由此带来的空位点与污染蛋白的结合

基于上述优势，Ni-NTA 高特异性的结合 6×His 标签蛋白（见图 10），并且实际应用中一步纯化获得的蛋白纯度一般在 95% 以上（见表 8）。

表 8 不同规格 Ni-NTA 产品纯化 IL-1 β 蛋白的纯度

树脂	树脂体积	菌体体积	产量	回收率 (%)	纯度*
Ni-NTA Magnetic Agarose Beads (micro-scale)	100 μ l	1 ml	33 μ g	~ 90%	~ 97%
Ni-NTA Superflow (small-scale)	500 μ l	320 ml	6 mg	~ 80%	~ 96%
Ni-NTA Superflow (medium-scale)	10 ml	1.7 L	109 mg	~ 80%	~ 98%
Ni-NTA Superflow (large-scale)	100 ml	18 L	2 g	> 88%	~ 97%

* Determined using Agilent Bioanalyzer (Protein 50 LabChip Kit)

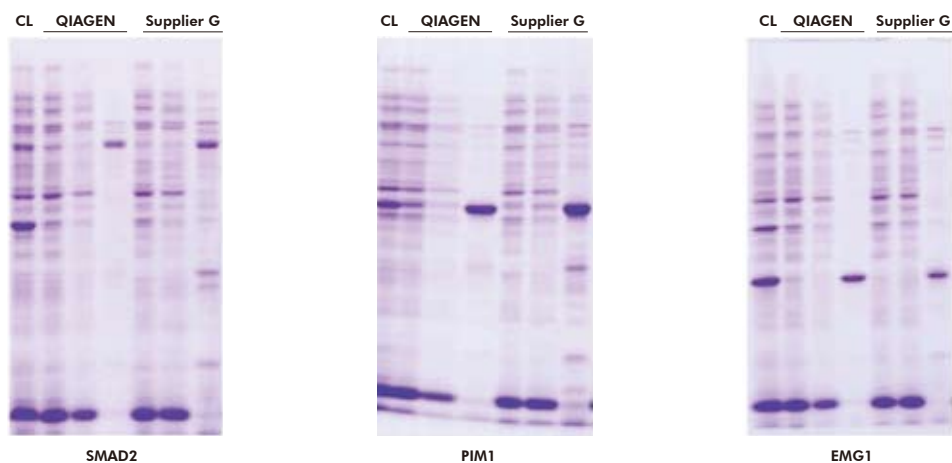


图 10 Ni-NTA 与 Ni-IDA 纯化 His 标签蛋白对比图。SMAD2 (左) PLM1 (中), EMG1 (右) 蛋白。结果表明利用 Ni-NTA 得到的蛋白纯度明显高于 Supplaer G 公司产品

更多对比数据, 请参见

http://www1.qiagen.com/literature/qiagennews/weeklyArticle/08_03/e06/default.aspx

Ni-NTA 纯化试剂规格及相应参数

QIAGEN 的 Ni-NTA 纯化基质产品种类齐全，根据纯化 6×his 标签蛋白的量分为大、中、小规模，可以进行手工纯化，也可以在蛋白纯化工作站上（如 QIAAsymphony™ SP*, QIAcube, AKTA, FPLC, BioLogic 等）进行高通量自动化纯化（见图 11，表 9）。

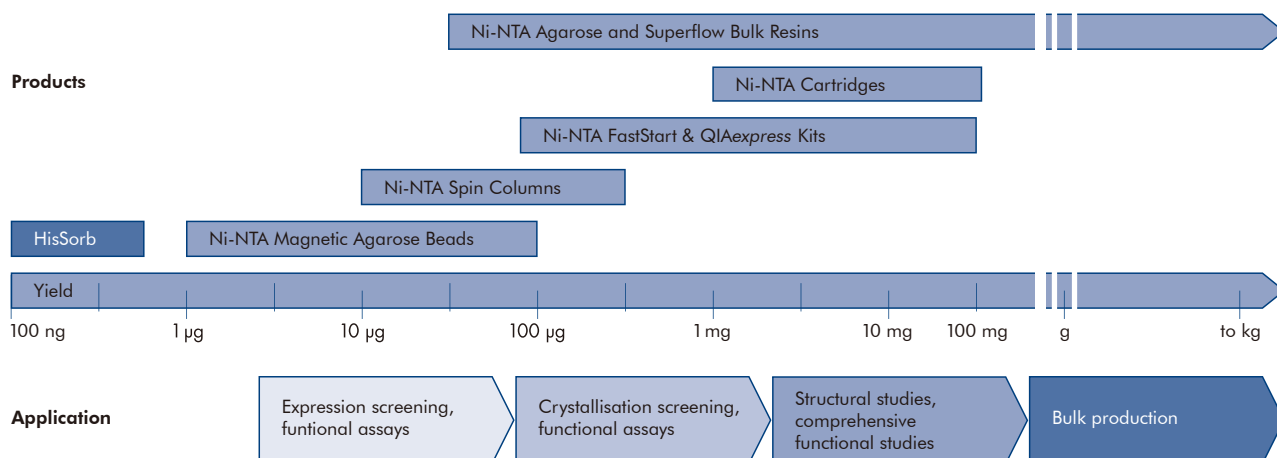


图 11 Ni-NTA 系列产品规格






表 9 根据不同蛋白量选择相应的 Ni-NTA 产品

6×His 蛋白产量	应用	自动/手动	产品
小规模纯化	1–30 μg	从低浓度细胞裂解液中纯化蛋白 小洗脱体积	手动 Ni-NTA Magnetic Agarose Beads
		高通量 (96 孔板)	自动 Ni-NTA Magnetic Agarose Beads
中等规模纯化	15–150 μg	低通量筛选	手动 / 自动 (QIAcube) Ni-NTA Spin Columns
	Up to 200 μg	快速纯化	自动 BioSprint 15 Ni-NTA Kit
	15–600 μg	高通量 (96 孔板)	自动 Ni-NTA Superflow 96 BioRobot Kit
	Up to 4 mg	高通量 (96 孔板)	自动 Ni-NTA Superflow 96 BioRobot Kit
大规模纯化	100 μg–100 mg	利用重力流纯化蛋白	手动 / 自动 Ni-NTA Agarose
	100 μg–100 mg	利用 FPLC 纯化蛋白	Ni-NTA Superflow Cartridge
	Up to 30 mg		Ni-NTA Superflow Columns
	5 mg–生产规模	利用 FPLC 纯化蛋白	手动 / 自动 Ni-NTA Superflow
两步纯化	<15 μg	超纯蛋白纯化 (>98%) 从哺乳细胞或昆虫细胞培养液中纯化蛋白	手动 / 自动 Ni-NTA and Strep-Tactin Magnetic Beads Ni-NTA and Strep-Tactin Superflow
	15 μg–2 mg		
即用型试剂盒	同时提供纯化和检测试剂	手动	Ni-NTA Fast Start Kit
其他	利用重力流或 FPLC 进行高效的固定金属亲和层板	可加载 Ni ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Co ²⁺	NTA Agarose, NTA Superflow, NTA Superflow Cartridge New

6×His 标签蛋白表达系统

表 10 按照 Ni-NTA 基质种类不同，详细比较了 Ni-NTA Agarose、Ni-NTA Superflow、Ni-NTA Magnetic Agarose Beads、Ni-NTA Spin Columns 的性能指标和参数。

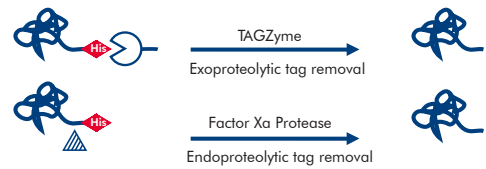
表 10 不同规格 Ni-NTA 产品的参数比较表

						
产品名称	Ni-NTA Magnetic Agarose Beads	Ni-NTA Spin Columns	Ni-NTA Agarose	Ni-NTA Superflow	Ni-NTA Superflow Columns	Ni-NTA Superflow Cartridges
纯化规模	小规模纯化	小规模纯化	小到中等规模纯化	大到生产规模纯化	小到大规模纯化	小到大规模纯化
结合能力	0.25–1 mg/ml	150 µg/column	20–40 mg/ml	20–40 mg/ml	30 mg/column	20–40 mg/ml
规格	2 × 1 ml 6 × 1 ml	50 column	25 ml 100 ml 500 ml	25 ml 100 ml 500 ml	12 × 1.5 ml 144 × 1.5 ml	5 × 1 ml 1 × 5 ml 100 × 1 ml 5 × 5 ml 100 × 5 ml
树脂基质	Magnetic Agarose Beads	Macroporous silica	Sepharose CL-6B	Superflow	Superflow	Superflow
树脂结构:	Agarose beads containing magnetic particles	Spherical, silica particles	Cross-linked, 6% agarose	Highly cross-linked, 6% agarose	Highly cross-linked, 6% agarose	Highly cross-linked, 6% agarose
组成	5% suspension 30% ethanol precharged with Ni ²⁺	Dry matrix packed in spin columns, precharged with Ni ²⁺	50% resin suspension in 30% ethanol, precharged with Ni ²⁺	50% resin suspension in 30% ethanol, precharged with Ni ²⁺	12.5% suspension in 30% ethanol, precharged with Ni ²⁺	50% resin suspension in 30% ethanol, precharged with Ni ²⁺
树脂颗粒大小/直径	20–70 µm	16–24 µm	45–165 µm	60–160 µm	60–160 µm	60–169 µm
最大线性流速	n.a	n.d	75–150 cm/h	3000 cm/h		
最大体积流速	n.a	n.d	0.5–1.0 ml/min	20 ml/min	n.a	10 ml/min (1ml cartridge) 40 ml/min (5ml cartridge)
最大压力	n.a	n.d	2.8psi (0.2bar)	140psi (10bar)		5 bar
pH 稳定性(≤2h)	3–14	2–8.5	2–14	2–14	2–14	2–14
pH 稳定性(≥2h)	4–12	3–7.5	3–12	3–12	3–12	3–12
保存条件	室温 (15-25°C) 或 4°C	室温 (15-25°C) 或 4°C	室温 (15-25°C) 或 4°C	室温 (15-25°C) 或 4°C	室温 (15-25°C) 或 4°C	室温 (15-25°C) 或 4°C

n.a: 不适用 n.d: 未经验证

6×His 标签去除系统

通常情况下 6×His 标签不会影响蛋白的结构和功能有影响。但对于特殊应用如三维结构分析, 药物治疗等需要去除 6×His 标签。利用 TAGZyme™ enzymes 或 Factor Xa Protease 去除标签, 反应灵敏, 切割效率高, 一些蛋白可以在 4°C 进行反应, 最大程度地防止了蛋白降解。



6×His 标签蛋白检测系统

QIAGEN 提供多种单克隆小鼠 Anti His Antibodies 对 6×His 标签蛋白进行检测 (见图 12)。有三种类型的抗体可以提供, 每一种可分别检测不同的 6×His 标签表位。检测试剂相关说明见表 11。

所有 Anti His Antibodies 确保:

- 高特异性, 高灵敏度的检测 C 端, N 端和内部的 6×His 标签
- 极低的背景信号

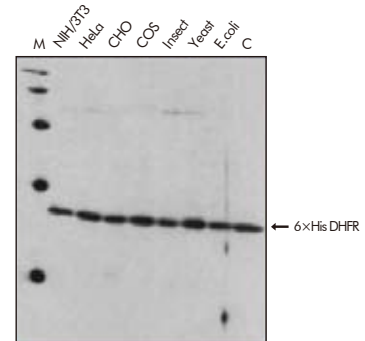


图 12 Anti-His 抗体在任何表达系统中灵敏检测 His 标签蛋白。利用 Penta.His HRP Conjugate 检测 His-tagged DHFR (3mg) 蛋白。M: 6×His 标签蛋白分子量标准 C: 对照试验

表 11 各种 Anti His 抗体参数比较表

	Penta-His Antibody	RGS-Hi ntibody	Tetra-His ntibody	Anti-His HRP C onjugates	Ni- TA Conjugates
Epitope detected	HHHHH	RGSHHHH*	HHHH	As relevant antibody [§]	n. a.
Dissociation constant, Kd (M)	$5 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-8}$	$1 \times 10^{-8} - 5 \times 10^{-8}$	$1 \times 10^{-8} - 5 \times 10^{-8}$	As relevant antibody [§]	n. d.
Sensitivity in dot blots(2 mm dots)	10 pg	10 pg	10 pg	10 pg	n. a.
Sensitivity in dot blots(2 mm dots)[†]	0.5 ng	0.5 ng	0.5 ng	n. d.	1–2 ng
Sensitivity in western blots[†]	50 pg	50 pg	50 pg	50 pg	n. a.
Sensitivity in western blots[‡]	2 ng	2 ng	2 ng	n. d.	2–5 ng
Direct detection on blots or in ELISA	Secondary antibody required	Secondary antibody required	Secondary ntibody required	YES	YES
Conjugated enzyme	None	None	None	Horseradish peroxidase	Alkaline phosphatase/ Horseradish peroxidase

n.a.: 不适用. n.d.: 未经验证。

* 适合利用 pQE-9, pQE-30, pQE-31, pQE-32, pQE-40, pQE-80L, pQE-81L, pQE-82L, pQE-100 DoubleTag, pRSET (Invitrogen) 或 pBlueBacHis (Invitrogen) 表达的重组蛋白。

† 利用化学发光基质检测。

‡ 利用碱性磷酸酶呈色基质进行检测。转膜过程中蛋白的损失将会导致 western blots 灵敏度相比 dot blots 低。

§ Anti-His HRP Conjugates 提供 Penta-His, Tetra-His 和 RGS-His variants, 上述偶联物和相应抗体对于 6×His 标签有同样的检测和结合能力。

QIAGEN 蛋白结晶平台

体内 (QIAexpress System) 或体外 (EasyXpress System) 表达蛋白, 并利用 Ni-NTA 树脂纯化得到蛋白后, 如果想详细了解蛋白的三维结构, 最直接有效的方案就是进行晶体培养, 利用 X-射线衍射进行结构分析。晶体培养实验流程分为 4 个步骤 (见图 13)。QIAGEN 的 NeXtal 蛋白结晶系列产品, 为蛋白晶体培养的各个阶段提供最优化的结晶溶液和筛选策略, 能在最短的时间内获得最广泛的条件筛选, 快速完成晶体培养实验。

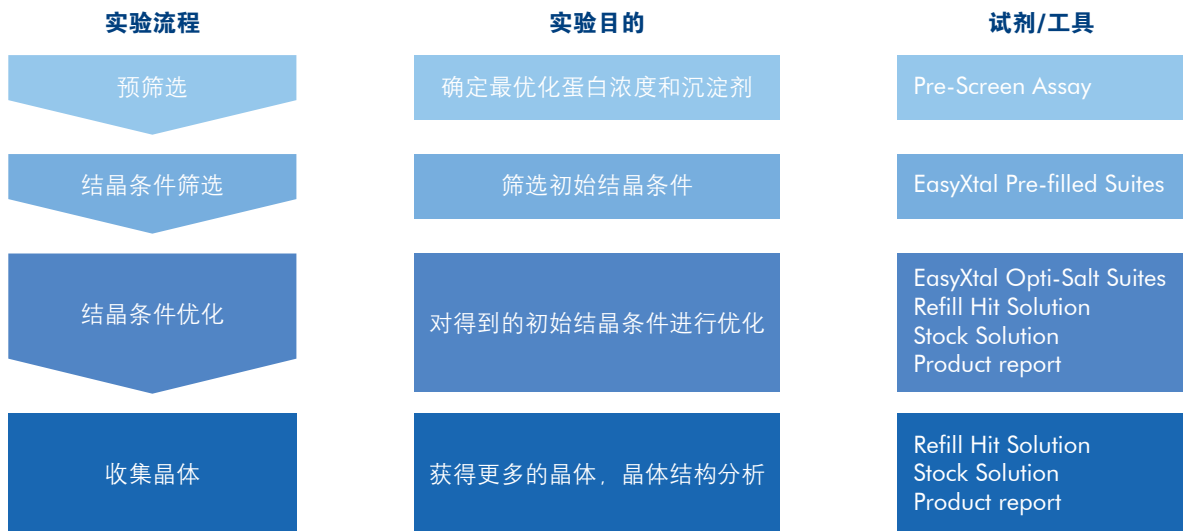


图13 蛋白结晶实验流程, 目的与相关试剂

QIAGEN 蛋白结晶平台目的是有效灵活地对蛋白、多肽、核酸、大分子复合物等结晶条件进行筛选和优化, 具有以下特点

- 蛋白结晶条件覆盖范围最广
- 包含了促进蛋白结晶最显著的试剂
- 专利的结晶工具 — 适用于快速建立结晶实验
- 在线获得产品报告 — 最大程度的重现结晶条件

QIAGEN 蛋白结晶产品规格

EasyXtal 及 NeXtal 蛋白结晶平台具有多种商业化的规格以适合各类蛋白结晶实验需要: EasyXtal Tool X-Seal, EasyXtal DG-Tool X-Seal, NeXtal DWBlocks 以及 NeXtal Tubes (见图 14)。



图14 EasyXtal 和 NeXtal产品规格

QIAGEN 蛋白结晶筛选系列

QIAGEN 蛋白结晶平台现提供 20 种蛋白结晶筛选系列供从事结晶实验的工作者进行选择,囊括了经典系列如 Classics I & II, 膜蛋白, 蛋白复合物以及最新筛选系列 (PACT, JCSG+), 以及独特的结晶优化溶液 (Opti-Salts)。QIAGEN 与 Joint Center for Structural Genomics (JCSG) 合作, 2007 年最新推出囊括 384 个最新结晶条件的 JCSG Core Suites, 上述条件来自 500,000 高通量结晶实验 (见表 12)。

表 12 QIAGEN 提供的 20 种蛋白结晶溶液

产品应用	产品规格	筛选系列
蛋白结晶初始浓度筛选	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Pre-Screen Assay
初始条件筛选		
经典系列, 用于蛋白初始结晶条件筛选实验	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	Classics, Classics Lite, Cryos, Classics II Suite
用于系统考察沉淀剂的浓度和pH值	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	pHClear and pHClear II Suites
利用优化的稀疏矩阵采样策略进行初始结晶条件筛选	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	JCSG+ Suite, JCSG Core New
用于系统考察pH, 阴离子和阳离子对蛋白结晶的影响	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	PACT Suite
单一沉淀剂进一步筛选		
在2种浓度, 4个pH值下, 使用各种盐类沉淀剂进行结晶条件筛选	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	Anions and Cations Suites
考察不同分子量的PEG对蛋白结晶的影响	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	PEGs and PEGs II Suites
精细考察AmSO ₄ 对蛋白结晶的影响	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	AmSO ₄ Suite
精细考察MPD对蛋白结晶的影响	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	MPD Suite
特殊应用筛选		
快速筛选使用聚合物, 醇类及盐类的结晶条件, 适合膜蛋白结晶条件筛选	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	MbClass and MbClass II Suites
适用于蛋白-蛋白复合物结晶条件的筛选	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	Protein Complex Suite
适合蛋白-核酸复合物初始结晶条件筛选	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	Nucleix Suite
补充筛选		
快速筛选使用聚合物, 醇类及盐类的结晶条件	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	ComPAS Suite
结晶条件优化		
对初始结晶条件进行快速优化	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Opti-Salts Suite

提供此规格, 不提供此规格, 提供Refill-Hits以及Stock Solutions



20种筛选系列
PreScreen Assay + Optimizing Suite

QIAGEN 蛋白结晶工具 / 耗材

除了结晶溶液, QIAGEN 还提供专利的结晶工具, 耗材以及 Refill-Hits 以及 Stock Solutions。结晶工具包括带有旋盖装置的 24 孔, 15 孔悬滴板, 以及适用于高通量筛选的 96 孔坐滴板等。对于每一种结晶条件都提供 Refill-Hits (4×12.5 ml) 用于围绕单一结晶条件进行筛选。另外还有数百种 Stock Solutions 用于重现结晶条件。

常见表达纯化问题建议

目标蛋白表达量低或不表达

- 表达序列 GC 含量过高：利用 DNA STAR 等软件对 GC 含量进行预测
- 稀有密码子问题：使用整合了稀有密码子 tRNA 的片断的新型宿主菌或利用 PCR 等方法将片断上的稀有密码子改造，换成其他编码同样氨基酸的密码子
- 载体或者表达菌不合适：更换载体或菌株
- mRNA 二级结构不利于蛋白表达：重新合成基因去除或改变影响 mRNA 二级结构的序列
- 蛋白本身性质导致表达量低如疏水性很强或表达的蛋白毒性较大：Vector NIT Suite 对蛋白的亲疏水性进行预测，对疏水性强的蛋白进行截短表达，去掉序列中含有疏水或信号肽的区域。
- 缺少 SD 序列或者不合理，或者被其它二级结构掩埋：检查启动子下游的 SD 序列，是否在插入表达基因时被切掉了或形成二级结构

使用 QIAGEN 预制蛋白表达载体可以轻松解决上述问题。

目标蛋白表观分子量与实际分子量不一致

- 由于等电点等原因，电泳时可能跑得快：用标准品作对照
- 缺少终止密码子：如果差距很大，需要做空质粒和空菌对照
- 存在蛋白多聚体：利用尿素变性（加巯基乙醇），然后进行电泳分析
- 发生移码突变：比对阅读框

His 标签蛋白不挂柱

- 表达过快，蛋白来不及形成正确的结构，导致 His 标签被包埋：在变性条件下纯化或在天然条件下添加少量变性剂（1-2M）对蛋白进行部分变性使 His 标签暴露
- 上样流速过快：降低流速，或进行循环过柱
- pH 值不合适：调节 pH 值，如变性蛋白可以在较高 pH 值下纯化
- 含有咪唑环含量的杂蛋白的存在，特别是核酸的存在，常常导致挂柱效率差：增大 NaCl 浓度减低非特异性结合
- 样品中存在第 VIII 族金属离子：采用 EDTA 等络合剂来消除金属离子的影响，增加超滤或凝胶过滤层析步骤，除去络合剂，以免影响亲和过程
- 蛋白发生降解：处理阶段加蛋白酶抑制剂；尽量进行冰上操作

His 标签蛋白不能从柱上洗脱

- 洗脱液强度不够：进行高浓度咪唑洗脱（250 mM, 500 mM）。添加 NaCl、甘油等试剂降低非特异性结合

杂蛋白条带多

- 存在非特性结合：增加咪唑浓度梯度以降低非特异性结合
- 蛋白量和 Ni-NTA 结合量比例不合适：根据 Ni-NTA 的结合能力进行上样

Ni-NTA 纯化试剂订购信息

产品	规格	货号
Ni-NTA Agarose		
Ni-NTA Agarose (25 ml)	25 ml nickel-charged resin (max. pressure: 2.8 psi)	30210
Ni-NTA Agarose (100 ml)	100 ml nickel-charged resin (max. pressure: 2.8 psi)	30230
Ni-NTA Agarose (500 ml)	500 ml nickel-charged resin (max. pressure: 2.8 psi)	30250
Ni-NTA Superflow		
Ni-NTA Superflow (25 ml)	25 ml nickel-charged resin (max. pressure: 140 psi)	30410
Ni-NTA Superflow (500 ml)	500 ml nickel-charged resin (max. pressure: 140 psi)	30450
Ni-NTA Superflow (100 ml)	100 ml nickel-charged resin (max. pressure: 140 psi)	30430
Ni-NTA Superflow Columns(12×1.5 ml)	For 12/144 6xHis-tagged protein preps: 12/144 polypropylene columns containing 1.5 ml	30622
Ni-NTA Superflow Columns (144×1.5 ml)	Ni-NTA Superflow,	30624
Ni-NTA Superflow Cartridges (5×1 ml)	5 cartridges pre-filled with 1 ml Ni-NTA Superflow: for automated purification of His-tagged proteins using liquid chromatography systems	30721
Ni-NTA Superflow Cartridge (1×5 ml)	1 cartridge pre-filled with 5 ml Ni-NTA Superflow: for automated purification of His-tagged proteins using liquid chromatography systems	30760
Ni-NTA Superflow Cartridges(5×5 ml)	5 cartridges pre-filled with 5 ml Ni-NTA Superflow: for automated purification of His-tagged proteins using liquid chromatography systems	30761
Ni-NTA Spin Kit and Columns		
Ni-NTA Spin Columns (50)	50 Spin Columns, Collection Tubes	31014
Ni-NTA Spin Kit (50)	50 Ni-NTA Spin Columns, Reagents, Buffers, Collection Tubes, 1 µg Control Expression Plasmid	31314
Ni-NTA Magnetic Agarose Beads and Magnets		
Ni-NTA Magnetic Agarose Beads (2×1ml)	2×1ml nickel-charged magnetic agarose beads (5% suspension)	36111
Ni-NTA Magnetic Agarose Beads(6×1 ml)	6×1 ml nickel-charged magnetic agarose beads (5% suspension)	36113
12-Tube Magnet Magnet	for separating magnetic beads in 1.5-ml or 2-ml tubes	36912
Ni-NTA Fast Start Kit (6)	For purification and detection of six 6×His-tagged protein preps: 6×Fast Start Columns, 3 µg Penta His Antibody, Lysis, Wash, and Elution Buffers, and Reagents	30600

体外，体内表达产品订购信息

产品	规格	货号
EasyXpress Protein Synthesis Mini Kit	For 20×50 µl reactions: E. coli extract, reaction buffer, RNase-free water, and positive-control DNA	32502
EasyXpress Protein Synthesis Maxi Kit	For reactions up to 4000 µl: 4×350 µl E. coli extract, reaction buffer, RNase-free water, and positive-control DNA	32506
EasyXpress Site-Specific Biotin Kit	For 5×25 µl reactions: E. coli extract, reaction buffer, RNase-free Water, biotinyl-lysyl tRNA (amber), and positive-control DNA	32602
EasyXpress Random Biotin Kit	For 20×50 µl reactions: E. coli extract, reaction buffers, RNase-free Water, biotinyl-lysyl tRNA (Phe), and positive-control DNA	32612
EasyXpress Insect Kit II	For 20×50 µl reactions: Spodoptera frugiperda insect cell extract, reaction buffers, in vitro transcription reaction components, RNase-free water, gel-filtration columns, and positive-control DNA	32562
EasyXpress Protein Synthesis Mega Kit	For 2×5 ml reactions: E. coli extract, reaction buffers, amino acid mix w/o methionine, methionine, RNase-free water, gel-filtration columns, and reaction flasks	32516
EasyXpress NMR Protein Synthesis Kit	For 2×5 ml reactions: E. coli extract, reaction buffers, amino acid mix w/o Arg, Lys, Ser, Thr, Val (supplied as individual amino acids), RNase-free water, gel-filtration columns, and reaction flasks	32526
C-Terminus pQE Vector Set	Expression of C-terminally 6×His-tagged proteins	32903
QIAexpress Type ATG Kit	Expression of C-terminally 6×His-tagged proteins	32169
cis-Repressed pQE Vector Set	cis-repressed expression of N-terminally 6×His-tagged proteins	32923
pQE-TriSystem Vector	Parallel expression of C-terminally 6×His-tagged proteins in three expression systems	33903
His-Strep pQE-TriSystem Vector Set	Parallel expression of Strep- and His-Strep-tagged proteins in three expression systems	32942
pQE-TriSystem Strep Vector		
TAGZyme pQE Vector Set	Expression of 6×His-tagged proteins whose tag can be removed using TAGZyme Enzymes	32932
pQE-30 Xa Vector	Expression of 6×His-tagged proteins containing a Factor Xa Protease recognition site	33203
pQE-100 DoubleTag Vector DNA	Expression of proteins tagged with both 6×His and Tag·100	33003
QIAexpress UA Cloning Kit	Fast and efficient PCR cloning of expression constructs	32179

蛋白检测产品订购信息请浏览

<http://www1.qiagen.com/Products/Protein/Detection.aspx>

蛋白结晶产品订购信息请浏览

<http://www1.qiagen.com/Products/Protein/Crystallization/>

QIAGEN 预制蛋白表达载体订购请登陆

<https://www1.qiagen.com/GeneGlobe/Default.aspx>

最新文献摘要

EasyXpress System 体外表达产品

1. Nuclear import of the transcription factor SHOOT MERISTEMLESS depends on heterodimerization with BLH proteins expressed in discrete sub-domains of the shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana*. Cole M, Nolte C, Werr W. *Nucleic Acids Res.* 2006 Mar;4: 1281-92
2. The AP2 transcription factors DORNROESCHEN and DORNROESCHEN-LIKE redundantly control *Arabidopsis* embryo patterning via interaction with PHAVOLUTA. John W. Chandler, Melanie Cole, Annegret Flier, Britta Grewe, and Wolfgang Werr. *Development*, May 2007; 134: 1653 - 1662.
3. YcfR (BhsA) Influences *Escherichia coli* Biofilm Formation through Stress Response and Surface Hydrophobicity. Xue-Song Zhang, Rodolfo García-Contreras, and Thomas K. Wood. *J. Bacteriol.*, Apr 2007; 189: 3051 - 3062.
4. Screening for soluble expression constructs using cell-free protein synthesis. Lamla, T., Hoerer, S., and Bauer, M.M. *Int. J. Biol. Macromol.* 2006, 39,111.
5. Optimized in vitro and in vivo expression of proteorhodopsin: A seven-transmembrane proton pump. Gourdon, P. et al. *Protein Expr Purif.* 2008, 58, 103.

QIAexpress System 体内表达产品

1. Modulating RssB activity: IraP, a novel regulator of sigma(S) stability in *Escherichia coli*. Bougdour A, Wickner S, Gottesman S. *Genes Dev.* 2006 Apr;7: 884-97
2. Acd, a peptidoglycan hydrolase of *Clostridium difficile* with N-acetylglucosaminidase activity. Dhalluin A, Bourgeois I, Pestel-Caron M, Camiade E, Raux G, Courtin P, Chapot-Chartier MP, Pons JL. *Microbiology (Reading, Engl.)* 2005 Jul;Pt 7: 2343-51

6×His标签蛋白检测系统

1. Nuclear import of the transcription factor SHOOT MERISTEMLESS depends on heterodimerization with BLH proteins expressed in discrete sub-domains of the shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana*. Cole M, Nolte C, Werr W. *Nucleic Acids Res.* 2006 Mar;4: 1281-92

Ni-NTA 纯化试剂

1. Use of dual affinity tags for expression and purification of functional peripheral cannabinoid receptor. Yeliseev A, Zoubak L, Gawrisch K. *Protein Expr. Purif.* 2007 May;1: 153-63
2. Dimeric structure of human Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 overproduced in *Saccharomyces cerevisiae*. Moncoq K, Kemp G, Li X, Fliegel L, Young HS. *J. Biol. Chem.* 2008 Feb;7: 4145-54
3. A proteome chip approach reveals new DNA damage recognition activities in *Escherichia coli*. Chen CS, Korobkova E, Chen H, Zhu J, Jian X, Tao SC, He C, Zhu H. *Nat. Methods* 2008 Jan;1: 69-74
4. Alternative splicing yields protein arginine methyltransferase 1 isoforms with distinct activity, substrate specificity, and subcellular localization. Goulet I, Gauvin G, Boisvenue S, Côté J. *J. Biol. Chem.* 2007 Nov;45: 33009-21
5. Production and comprehensive quality control of recombinant human Interleukin-1beta: a case study for a process development strategy. Block H, Kubicek J, Labahn J, Roth U, Schäfer F. *Protein Expr. Purif.* 2008 Feb;2: 244-54

更多参考文献请访问: www.qiagen.com/Support/References

整合的蛋白质组解决方案 II — 从 6×His 标签蛋白表达纯化到结晶

凯杰生物技术上海有限公司

Tel: 021-38653865

Fax: 021-38653965

技术支持热线

Tel: 800 988 0325

Fax: 800 988 0327

