

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
МОСКОВСКИЙ ФИЗИКО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ  
(ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ)

*Кафедра биофизики ФОПФ*

# **МЕТАЛЛ-ХЕЛАТНАЯ АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ**

Учебно-методическое пособие

Составители:           И. С. Охрименко  
                                  В. В. Чупин

МОСКВА  
МФТИ  
2014

УДК 542.06

Рецензент

Кандидат биологических наук *С. В. Леонов*

**Металл-хелатная аффинная хроматография** : учебно-методич. пособие / сост.: И. С. Охрименко, В. В. Чупин. М. : МФТИ, 2014. – 24 с.

В учебно-методическом пособии мы суммировали наши знания о металл-хелатной аффинной хроматографии: описали принцип её работы, выделив на наш взгляд самое важное. Методическое пособие облегчит процесс обучения тем, кто только начинает использовать её в работе, так как послужит хорошим введением перед изучением специализированной литературы, методических указаний, учебников, инструкций, и научных статей с описанием очистки белков с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии.

Предназначено для студентов, слушающих курсы молекулярной биологии, читаемые на кафедре биофизики ФОПФ МФТИ.

**УДК 542.06**

© Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)», 2014  
© И. С. Охрименко, В. В. Чупин, сост., 2014

## Оглавление

Введение.....	4
Использованные сокращения.....	5
Место МХАХ в процессе наработки рекомбинантного белка.....	6
Хелатирование.....	6
Несколько слов о МХАХ.....	7
Принципы МХАХ.....	8
Хелатирующие группы.....	9
Типичные методы проведения МХАХ.....	11
Подготовка хроматографической колонки.....	11
Иммобилизация на сорбенте ионов металла.....	13
Связывание белка металл-хелатным сорбентом.....	18
Элюция белка.....	18
Типичные буферные растворы для МХАХ.....	15
Очистка нерастворимых белков.....	15
Очистка мембранных белков.....	16
Связывание с металл-хелатным сорбентом в варианте «batch».....	18
Рефолдинг белка, связанного с металл-хелатным сорбентом.....	18
Регенерация хелатирующего сорбента.....	19
Очистка сорбента.....	19
Стерилизация колонки.....	20
Хранение металл-хелатного сорбента.....	20
Некоторые хелатирующие сорбенты и колонки.....	21
Литература.....	23

## Введение

Сегодня в России производство и использование рекомбинантных белков значительно возросло по сравнению с тем уровнем, который мы наблюдали десять лет назад. Это стало возможным в частности благодаря тому, что сейчас доступно множество расходных материалов, известно большое количество методов синтеза и очистки рекомбинантных белков. Поэтому хорошее понимание методов очистки рекомбинантных белков и умение эффективно применять эти методы становятся обязательными для молодых специалистов, начинающих свой трудовой путь в сферах деятельности, связанных с получением рекомбинантных белков. Металл-хелатная аффинная хроматография (МХАХ, Immobilised Ion Affinity Chromatography — ИМАС) — классический метод очистки рекомбинантных белков, особенно широко применяющийся в научных исследованиях благодаря своей эффективности и простоте.

Авторы благодарят Мишина А.В., Лугинину А.П., Хабибуллину Н.Ф. за плодотворное обсуждение методического материала и помощь в подготовке настоящего пособия, а также Шульгу А.А., лабораторные методики которого легли в основу данного издания и вдохновили авторов на написание учебно-методического пособия.

## Использованные сокращения

MXAX	Металл-Хелатная Аффинная Хроматография
IMAC	Immobilised Ion Affinity Chromatography
His	Histidine, аминокислотный остаток гистидина
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Этилендиаминтетрауксусная кислота, ЭДТА)
EGTA	Ethyleneglycoltetraacetic acid (Этиленгликольтетрауксусная кислота, ЭГТА)
NTA	Nitrilotriacetic acid (нитрилоуксусная кислота)
IDA	Iminodiacetate (иминодиацетат)
CM-Asp	Carboxymethylaspartate (карбоксиметиласпартат)
TED	Tris(carboxymethyl) ethylenediamin (трис(карбоксиметил)этилендиамин)
DTT	Dithiothreitol (дитиотреитол, ДТТ)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, (4-(2- гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфо кислота)
ATP, АТФ	Adenosine triphosphate, Аденозинтрифосфат
CMC	Critical micelle concentration (Критическая концентрация мицеллообразования)
SDS-PAGE	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis in presence of Sodium dodecyl sulfate (Полиакриламидный гель в присутствии додецил сульфата натрия)
DDM	n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside (n-dodecyl- $\beta$ -D- мальтопиранозид)
CHS	Cholesteryl hemisuccinate (Холестирин гемисукцинат)

## **Место МХАХ в процессе наработки рекомбинантного белка**

Преимущества использования аффинных меток (тагов) для облегчения очистки рекомбинантных белков и их детектирования широко известны. Обычно на первом этапе для наработки рекомбинантного белка проводят клонирование целевого гена в подходящий экспрессионный вектор так, чтобы ген, кодирующий аминокислотную последовательность аффинной метки, и ген целевого белка следовали непосредственно друг за другом. Далее следует трансформация клеток соответствующего продуцента (организма хозяина) данным вектором. Сейчас доступно несколько продуцентов, включая такие организмы, как бактерии, дрожжи, растения, грибы, простейшие, насекомые, трансгенные животные и растения, клетки млекопитающих. Каждый организм-хозяин имеет свои преимущества и недостатки, и важно их учитывать при окончательном выборе продуцента. После начального скрининга оптимальных условий экспрессии гена каждого отдельного белка следует масштабирование процесса наработки биомассы продуцента для получения больших количеств целевого белка, необходимых для функциональных и структурных исследований. Следовательно, необходимо и очищать большие количества белка быстро и эффективно.

Очистка белков, содержащих в своей структуре таги, достаточно проста, и можно сэкономить много времени благодаря высокой специфичности метки рекомбинантного белка и лиганда иммобилизованного на хроматографическом сорбенте. Чистота выделенного с помощью аффинной хроматографии белка может достигать 95%. Конечно же, дальнейшая очистка рекомбинантного белка необходима, если требуется большая степень чистоты, но применение аффинной метки (или тага) позволяет уже на первом этапе очистки избавиться от большинства примесных белков, облегчает и дальнейшую очистку.

### **Хелатирование**

Термин хелатирование (от лат. *chelate* — клешня) означает образование связей между ионами металлов и лигандами, имеющими несколько донорных центров. Хелаты представляют собой центральный ион и координированные вокруг него лиганды (рис. 1).

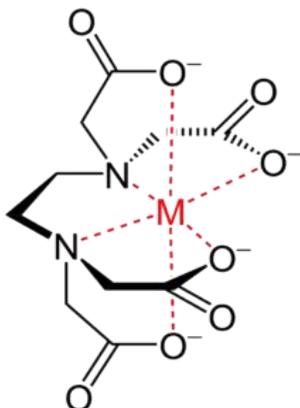


Рис. 1.

Образование координационных связей EDTA с ионом металла.

## Несколько слов о МХАХ

Металл-хелатная аффинная хроматография и используемая в ней полигистидиновая метка (His-таг) широко распространены, потому что последовательность нескольких аминокислотных остатков гистидина (6–9 шт., 4 и 10 шт. используются реже) имеет маленький размер, легко синтезируется и редко влияет на функции белка, его специфическую активность, структуру [1]. Сорбенты для МХАХ, заряженные, как правило, ионами двухвалентных металлов, таких как  $Ni^{2+}$ , специфично связываются с белками, содержащими полигистидиновый таг как растворимыми, так и изначально нерастворимыми, но растворёнными в денатурирующих условиях, например полученными из телец включения путём растворения последних в денатурирующих агентах или солиобилизованных в детергентах, как в случае мембранных белков. Успешная очистка с помощью МХАХ даёт высокий выход активного белка, возможен рефолдинг белка иммобилизованного на аффинном сорбенте [2]. Тем не менее в связи с тем, что многие белки имеют остатки гистидина и/или цистеина, они могут связываться с металл-хелатным сорбентом так же, как и белок с His-тагом. В таких случаях часто необходимо подбирать условия сорбции белка, промывки и элюции для того, чтобы элюировать целевой белок как можно более чистым. В частности, увеличение концентрации имидазола при сорбции целевых белков позволяет уменьшить количество адсорбированных примесей [3]. Ещё необходимо помнить, что металлопротеиназы активны в присутствии ионов двухвалентных металлов, следовательно, необходимо проводить МХАХ при 2–8 °С, минимизировать её время, промывать белок на

колонке, избавляясь от примесей, после элюции белка сразу добавить к фракции EDTA или EGTA до концентрации 1–5 мМ. Чтобы предотвратить неспецифический гидролиз белков металлопротеиназами в присутствии ионов двухвалентных металлов ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ) в процессе хроматографии, также необходимо добавлять к белку ингибиторы протеиназ без EDTA (например, #11873580001 Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail, (Roshe, Германия)). Вместе с тем, после хроматографии следует удалить имидазол из фракции белка (диализом, гель-фильтрацией) [3].

## Принципы МХАХ

В металл-хелатной аффинной хроматографии используется свойство белков связываться с иммобилизованными ионами металлов, таких как  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ . Специфическое связывание осуществляется за счет наличия на поверхности белка свободных электронодонорных групп. В условиях МХАХ (нейтральные значения рН и высокие концентрации соли) в качестве потенциальных лигандов в белке могут выступать имидазольная группа гистидина ( $\text{pK} \sim 6.7$ ), тиольная группа цистеина ( $\text{pK} \sim 8.5$ ) и индольная группа триптофана ( $\text{pK} \sim 9.41$ ). В определенных условиях в подобных взаимодействиях могут принимать участие С-концевые аминокислоты ( $\text{pK} \sim 7.7$ ), а также остатки аспарагиновой и глутаминовой кислот ( $\text{pK} \sim 3.9$ ). По прочности образуемых комплексов эти аминокислоты располагаются в ряду: His, Cys > Asp, Glu >> другие аминокислоты. Было показано, что наличие остатков гистидина на поверхности белковой молекулы является необходимым и достаточным условием для её сорбции на хелатирующем сорбенте: сорбция требует наличия как минимум двух близко расположенных остатков гистидина, которые могут быть сближены как в первичной, так и в третичной структуре белка [1, 3] (рис. 2). Окружение остатков гистидина является дополнительным фактором, влияющим на координирование белка хелатированными ионами металлов. Вследствие того, что величина рК гистидина зависит в значительной степени от заряда соседних аминокислотных остатков, некоторые другие остатки (Tyr, Arg, Phe, Lys) могут усиливать первичную сорбцию белков, обусловленную благоприятным расположением и доступностью остатков гистидина [3].

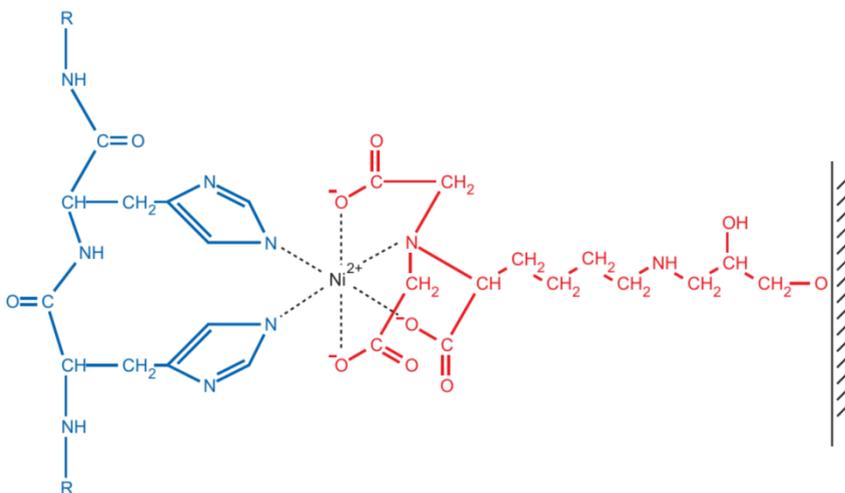


Рис. 2. Координационные химические связи, образованные двумя аминокислотными остатками гистидина и ионом  $\text{Ni}^{2+}$ , иммобилизованным на металл-хелатном сорбенте Ni-NTA (Qiagen, ФРГ) [4]

## Хелатирующие группы

Наиболее широко распространены следующие хелатирующие группы: iminodiacetate (IDA), nitrilotriacetic acid (NTA) carboxymethylaspartate (CM-Asp), Tris(carboxymethyl) ethylendiamin (TED) [3] (Рис. 3). Данные группы образуют различные по числу и качеству координационные связи с ионами двухвалентных металлов (рис. 4). Ионы имеют различные размеры, и от этого зависит возможность образования связей с правильной геометрией для каждой отдельной хелатирующей группы. Так, IDA образует две связи с ионом двухвалентного металла, NTA — 3, CM-Asp — 4, TED — 5 [3, 5].

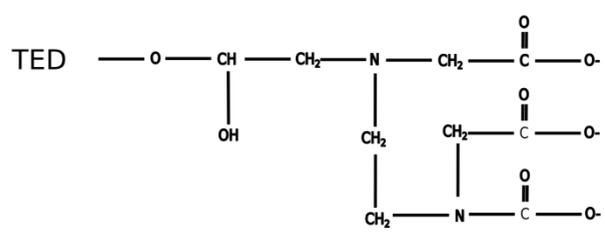
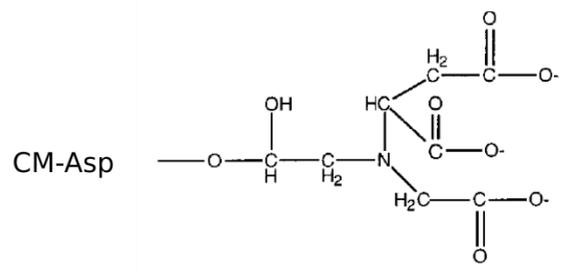
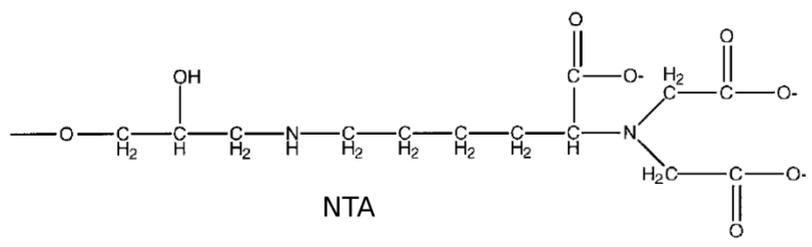
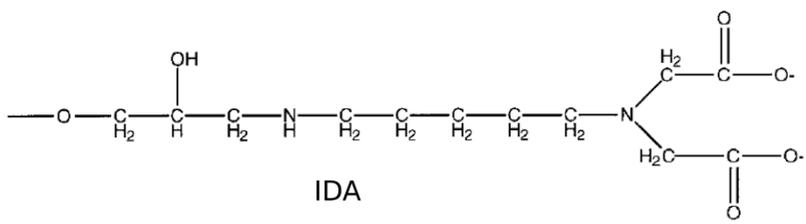


Рис. 3. Химическая структура хелатирующих групп [4]

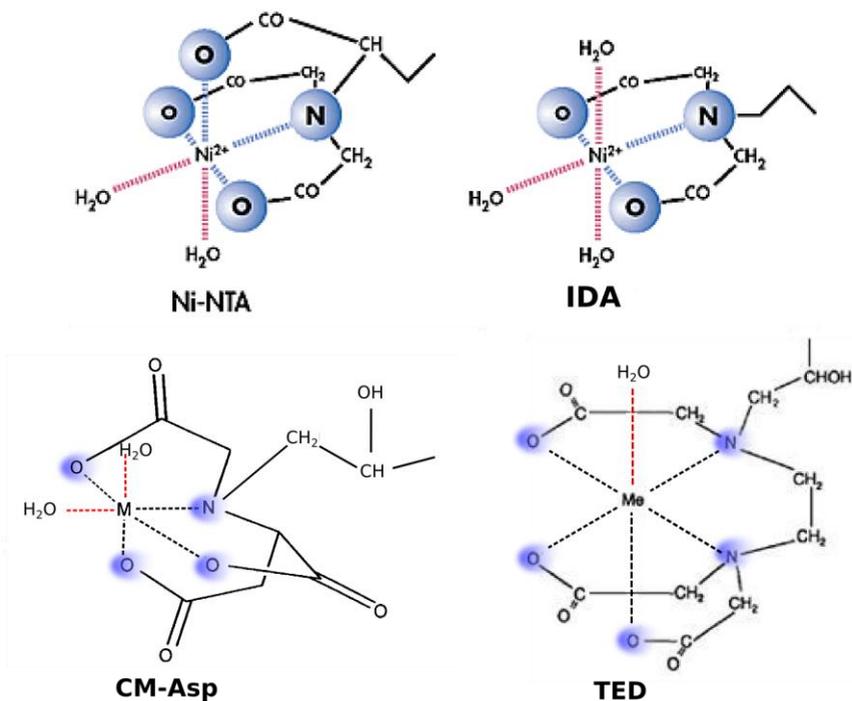


Рис. 4. Координационные комплексы, образованные различными хелатирующими группами и ионами двухвалентных металлов [1, 3, 4, 6]

## Типичные методы проведения МХАХ

### Подготовка хроматографической колонки

Хроматографическая колонка с сорбентом может быть подготовлена для хроматографии посредством протекания через неё буфера под действием собственного веса (здесь достаточно налить нужное количество суспензии сорбента в подходящую колонку) или для прокачивания буфера с помощью насоса хроматографической системы.

1. Прочитать инструкции по подготовке сорбента к работе, по набивке колонки, отметить критические параметры сорбента — максимально-допустимое давление, максимально возможную скорость потока через сорбент (мл/мин), допустимые буферные растворы, рН, химические вещества. Внести необходимые коррективы в настоящую методику.
2. Перемешать сорбент (обычно поставляемый в 20% этаноле) поворачиванием и покачиванием флакона (не использовать мешалник и магнитную мешалку) до образования гомогенной суспензии.
3. Заполнить все входные шланги и отверстия колонки 20%-м этанолом. Закрыть выходной шланг или отверстие.
4. Резко, одним приемом, отобрать нужный объём суспензии не прекращая её перемешивание и так же одним приёмом залить суспензию сорбента в колонку. Объём суспензии следует выбрать с учётом того, что сорбент составляет некоторую долю (например, 50%) от поставляемой суспензии.

*Удобно использовать серологическую пипетку. Важно, чтобы внесение сорбента в колонку произошло в один приём. Если объёма колонки не хватает для внесения всей необходимой суспензии разом, то следует использовать специальные удлинители для набивки колонок.*

5. Немедленно заполнить свободное пространство в колонке 20%-м этанолом, вставить верхний адаптер и погрузить его в этанол так, чтобы не осталось пузырей воздуха между адаптером и сорбентом. Подсоединить верхний адаптер колонки к насосу.
6. Открыть выходное отверстие колонки. Включить поток 20%-го этанола. Давление и скорость потока при набивке выбираются большие, чем рекомендуемые для очистки, но не превышающие допустимое давление для данного сорбента.
7. Следует убедиться, что сорбент равномерно оседает и сжимается потоком жидкости. Давление на колонке при этом должно быть постоянным и не должно резко расти, что происходит при разрушении сорбента слишком большим потоком. После того, как сорбент перестанет оседать и сжиматься и образуется чёткая верхняя его грань, следует подвести верхний адаптер вплотную к верхнему слою сорбента и вмять адаптер в сорбент на 1–2 мм.

*Удобно при подводе верхнего адаптера к сорбенту открутить шланг верхнего адаптера от хроматографа и собирать вытекающую при понижении адаптера жидкость в лабораторный стакан.*

8. Далее прокачать через колонку трех-пятикратный объём колонки 20%-го этанола. Необходимо следить за проводимостью раствора, выходящего с колонки, и показателями оптического преломления: по изменениям этих параметров удобно следить за сменой раствора для хранения на этанол, затем на воду и буфер.  
*В дальнейшем скорость потока не может превышать 75% от скорости потока используемого при упаковке геля.*
9. Для использования перевести колонку в воду, прокачав через неё 5–10 её объёмов воды, далее аналогично перевести её в нужный буферный раствор.

### **Иммобилизация на сорбенте ионов металла**

1. Перевести сорбент в воду, прокачав через него два-пять объёмов воды.
2. Приготовить 0.1–0.3 М раствор соли переходного металла и нанести его на колонку. Объём раствора должен равняться приблизительно объёму колонки.
3. Отмыть сорбент по меньшей мере 5–10 объёмами деионизованной воды.
4. Уравновесить сорбент в стартовом буфере, прокачав через него по крайней мере 5 объёмов стартового буфера.

### **Связывание белка металл-хелатным сорбентом**

Связывание белка на металл-хелатном сорбенте обычно происходит в интервале pH 5.5–8.5 (зависит от сорбента), но оно сильнее при щелочном pH. Рекомендуемые буфера – ацетат натрия (50 мМ) и фосфат натрия (10–200 мМ), Tris-HCl (20–50 мМ), HEPES (20 мМ). В образце, наносимом на колонку, не должны присутствовать такие хелатирующие агенты, как EDTA или цитрат. Необходимо добавлять в образец NaCl до концентрации 0.15–0.5 М для того, чтобы увеличить ионную силу раствора белка и минимизировать неспецифические ионные

взаимодействия с аффинной матрицей. Присутствие детергентов и денатурирующих агентов обычно не влияет на сорбцию белков. При связывании белков с матрицей происходит частичное замещение хелатированных ионов металла, что можно заметить по окрашиванию элюата особенно, если используются ионы меди [4, 5, 7].

Промыть сорбент со связанным на нём белком следует 5-ю объёмами сорбента буфером, используемым для нанесения белка, далее буфером для элюции, но без имидазола. В особенно чувствительных к примесям экспериментах применяют промывку колонки 8 мМ раствором АТФ для элюции белков, меняющих конформацию в присутствии АТФ, так как их хелатирующие свойства при этом меняются и неспецифическое связывание с металл-хелатным сорбентом ослабевает. После пропускания через сорбент раствора АТФ необходимо следом пропустить через колонку 5–10 объёмов буфера без АТФ.

### Элюция белка

Белок можно элюировать:

- понизив рН (линейно или ступеньками). Большинство белков элюируются в интервале рН от 6 до 4. Конечный рН обычно 3–4. Для этой процедуры подходят такие буфера, как ацетатный, цитратный или фосфатный

- такими веществами, как имидазол (0–0.5 М), гистидин (0–0.05 М) (рис. 5), хлорид аммония (0–2 М), или другими веществами, которые имеют сродство к хелатированным ионам металла. Элюцию можно осуществлять градиентом или ступеньками (дискретным повышением концентрации элюата)

- хелатирующими агентами, такими как EDTA или EGTA (0.05 М раствор). Эти вещества связывают ионы металла и вызывают тем самым элюцию белков. В этом случае разделения белков по сродству к ионам двухвалентных металлов не произойдет.

Во всех случаях в буфер для элюции следует включать NaCl в концентрации 0.15–0.5 М, так как ёмкость сорбента крайне мала в отсутствие соли и в таком случае белок сразу съэлюируется с колонки как только на неё начнёт поступать буфер для элюции.

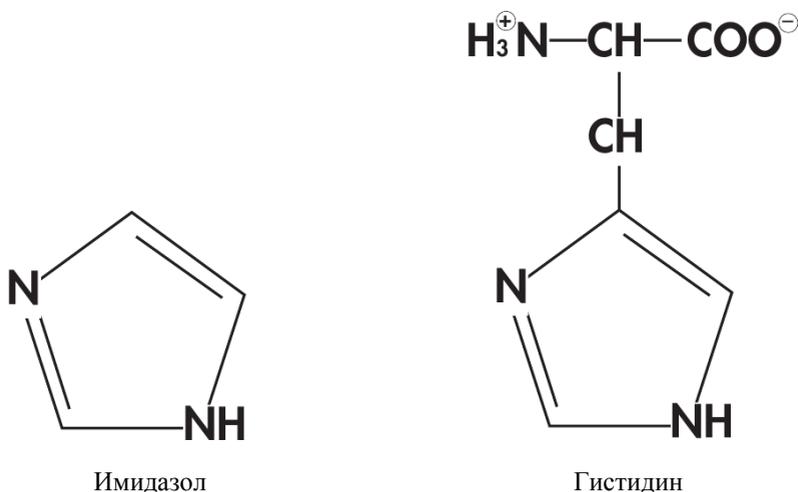


Рис. 5. Химическая структура имидазола и гистидина

### Типичные буферные растворы для МХАХ

Буфер для нанесения и связывания белка на сорбенте:

50 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазола.

Буфер для отмывки сорбента:

50 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазола.

Буфер для элюции:

50 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 300 мМ NaCl, 250 мМ имидазола.

### Очистка нерастворимых белков

Белки с His-тагом (например, образующие тельца включения при синтезе в *E. coli*) можно растворить в буферах, содержащих 8 М мочевины, 6 М гуанидин гидрохлорида, 1% лаурил-саркозина. pH

белкового раствора должен быть в районе 7–8, для лучшего растворения возможно кратковременно повысить рН (точные концентрации детергентов, денатурирующих агентов и рН должны быть подобраны). Колонку перед нанесением на неё растворённого белка необходимо уравновесить в том же буфере, что использовался при растворении, прокачав через неё около 5-ти объёмов буфера. После нанесения белка необходимо промыть сорбент буфером, использованным для его растворения, и далее при элюции также должны использоваться буферы, содержащие подобранное количество детергента (рис. 6) [2, 4].

### **Очистка мембранных белков**

Мембранные белки с His-тагом солибилизируются в буферах, содержащих детергент (часто это 1% DDM) или систему детергентов (например, DDM/CHS 5/1). рН белкового раствора обычно выбирают в районе 7–8, (точные концентрации детергентов и рН должны быть подобраны). Колонку перед нанесением на неё солибализованного белка необходимо уравновесить в буфере с тем же содержанием детергента, что использовался при растворении мембранной фракции, прокачав через неё около 5-ти объёмов буфера. После нанесения белка необходимо промыть сорбент буфером, использованным для его растворения, далее применяют промывку колонки 8 мМ АТФ, промывают колонку буфером с меньшим содержанием детергента, но большим, чем СМС (для DDM это 0.01%). Элюцию белка проводят прокачивая через сорбент буфер с добавлением 300 мМ имидазола (в случае наличия 10 His), после чего удаляют имидазол из фракций диализом или гель-фильтрацией, так как имидазол дестабилизирует мембранные белки. Все буфера кроме буфера для элюции могут содержать 5-30 мМ имидазола для исключения неспецифического связывания хелатным сорбентом белков.

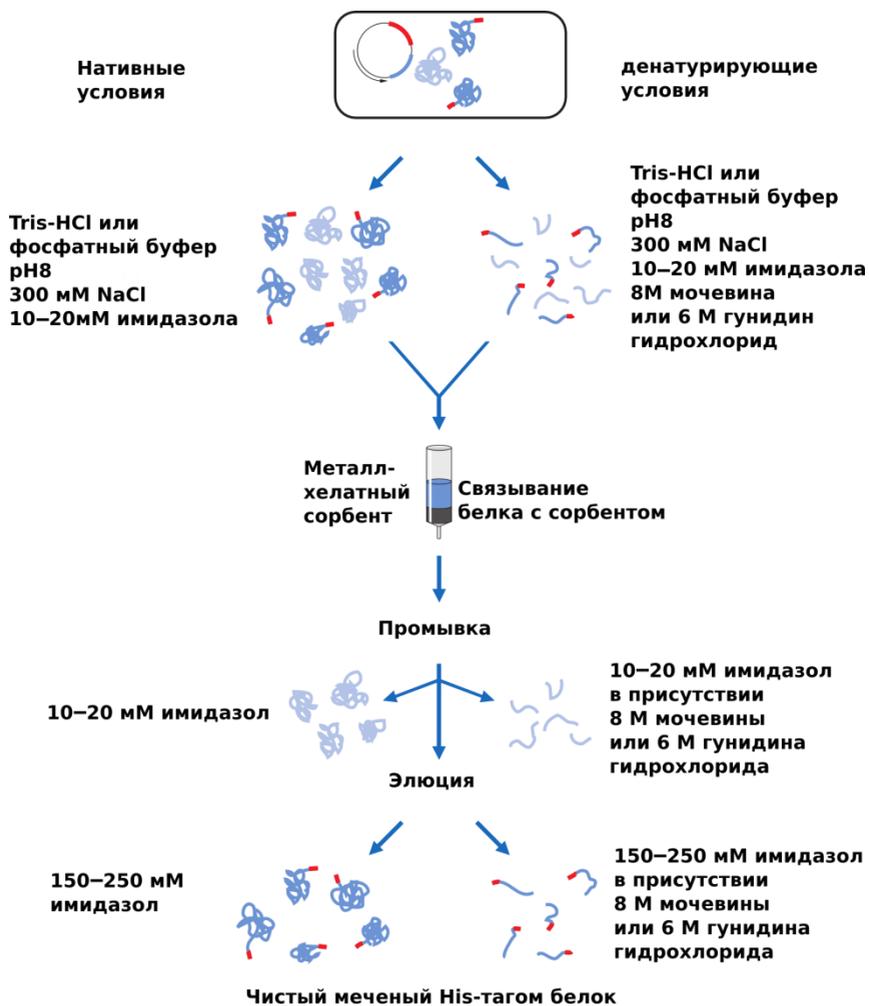


Рис. 6. Схема проведения МХАХ в нативных и денатурирующих условиях [3]

## **Связывание белка с металл-хелатным сорбентом**

### **в варианте «batch»**

Иногда удобно сорбировать белок, не прокачивая его через сорбент, а перемешивая его с сорбентом (метод «batch»). В таком случае для сорбции белку доступен весь объём сорбента, и не происходит локального концентрирования белка в верхней части сорбента как при прокачивании раствора белка через колонку. Это позволяет уменьшить агрегацию белка. Также сорбция белка во всём объёме сорбента позволяет сорбировать белок плохо взаимодействующий со смолой, например белок без His-тага, но содержащий остатки гистидина и цистеина в аминокислотной последовательности.

Для постановки сорбции в варианте batch сорбент после промывки на колонке и уравнивания в буфере для нанесения белка следует ресуспендировать пипеткой с белком до разрушения комков сорбента, т.е. до гомогенного состояния и инкубировать при постоянном перемешивании при 2–8°C один час или в течении ночи. Далее снова поместить сорбент в колонку, и подготовить колонку к работе как описано выше. Собрать фракцию белков не связавшихся с сорбентом, провести промывку сорбента и элюцию как описано для нативных или денатурирующих условий [1, 3].

## **Рефолдинг белка, связанного с металл-хелатным сорбентом**

После сорбции на колонке денатурированного белка и после его промывки буфером с денатурирующим агентом возможно снизить до нуля содержание денатурирующего агента. При этом белок или его часть может образовать нерастворимый осадок, который нужно будет потом удалить с колонки, промывая её буфером с высокой концентрацией денатурирующего агента (8 М мочевины, 6 М гуанидин гидрохлорида) [2, 3, 4] или другими методами, см. ниже.

В случае если для растворения белка использовался детергент, то его можно заменить на другой при промывке колонки, например лаурил-саркозин заменить на тритон X-100, и затем снизить содержание детергента и убрать его остатки, связавшиеся с белком и сорбентом пропустив через колонку 5 объёмов 10 мМ раствора бетта-циклодекстрина.

Так же одновременно с уменьшением концентраций детергентов и денатурирующих агентов возможно уменьшать концентрации

восстановителей в буфере, проходящем через колонку, для того, чтобы в белке могли образовываться дисульфидные связи. При этом надо помнить, что при работе с метал-хелатными сорбентами запрещается применять ДТТ в концентрациях более 1 мМ, 2-меркаптоэтанол может быть использован в концентрациях до 20 мМ.

*Тритон X-100 имеет большое поглощение на 280, что делает невозможным детектирование белков, элюированных с колонки, поэтому фракции, содержащие тритон X-100, должны быть проанализированы с помощью SDS-PAGE.*

*Циклодекстрины плохо растворяются в воде, предел растворения бета-циклодекстрина 15 мМ.*

### **Регенерация хелатирующего сорбента**

1. Прокачать через колонку 10 объемов 0.05 М EDTA, 0.5 М NaCl. *Таким образом с колонки удаляются ионы металла.*
2. Удалить с колонки EDTA, прокачав через неё 5–10 объемов 0.5 М NaCl.
3. Имобилизовать ионы металла, см. выше.

### **Очистка сорбента**

*Направление потока буфера через колонку лучше инвертировать, так как чаще всего загрязняется верхняя часть колонки, и при её очистке, в случае когда буфер подаётся на колонку снизу, растворённые загрязнения верхней части колонки не идут через весь объём сорбента, а уносятся потоком в слив. По окончании чистки, необходимо промыть колонку 5–10 объёмами стартового буфера.*

Белки, связавшиеся с колонкой посредством неспецифических ионных взаимодействий, элюируются при пропускании через неё одного её объёма 2М NaCl. Для лучшей элюции можно инкубировать сорбент с 2 М NaCl 10–15 мин.

Нерастворимые белки, а также белки, неспецифически связавшиеся с колонкой посредством гидрофобных взаимодействий, и липопротеины, можно элюировать 0.5–1 М NaOH. Для лучшей элюции можно инкубировать сорбент с 0.5–1 М NaOH 1–2 ч.

*Перед нанесением щелочи на колонки необходимо убедиться, что на ней нет ионов металлов. Например, ионы  $\text{Ni}^{2+}$  в присутствии щёлочи, гидратируются и образуют нерастворимый преципитат ( $\text{Ni}^{2+}$  (растворимый) +  $2\text{OH}^-$  (растворимый)  $\Rightarrow$   $\text{Ni}(\text{OH})_2$  (нерастворимый)) прямо на колонке, и колонка будет безвозвратно испорчена.*

Для дальнейшей отмывки колонки (также и от загрязняющих её липидов) можно попробовать прокачивать через колонку возрастающий градиент органических растворителей, таких как этанол (0–70%) или изопропанол (0–30%). Объем градиента – 4 объёма колонки. Далее – 2–5 объёма неионного детергента в кислых и щелочных условиях. Например, можно использовать 0.1–0.5% неионный детергент лаурил-саркозин в 0.1 М уксусной кислоте. Возможно промывать колонку в течение 1–2 часов. После детергента обязательно промыть колонку 5–10 объёмами 70% этанола.

Для разрушения, белков загрязняющих колонку, возможно закачать на колонку 1 объём раствора трипсина, химотрипсина, папаина, протеиназы К в присутствии детергента или денатурирующего агента (гуанидин гидрохлорид до 1 М, мочевины до 4 М).

### **Стерилизация колонки**

Часто требуется исключить микробные загрязнения в белке, элюируемого с колонки.

Для этого необходимо прокачать через колонку 5 объёмов 0.5–1 М NaOH и инкубировать в щелочи 1 час, при этом направление потока должно быть инвертировано, так как микробные загрязнения находятся в верхней части колонки. Далее следует промыть колонку 5–10 объёмами стерильной воды (возможна стерилизация фильтрацией через мембрану с диаметром пор 0.1–0.22 мкм) и уравновесить сорбент 3–5 объёмами стерильного стартового буфера.

### **Хранение металл-хелатного сорбента**

Хранить сорбент необходимо в 20% этаноле или 10 мМ NaOH при 2–8 °С.

## Некоторые хелатирующие сорбенты и колонки

Наиболее широко распространены металл-хелатные сорбенты следующих производителей: Clonotech (США), Qiagen (ФРГ), GE Healthcare (США) (табл. 1). В данных сорбентах в качестве матрицы использована сефароза (агароза с поперечными сшивками), хелатирующие группы закреплены на агарозной матрице через протяжённый спейсер при помощи эфирной связи (рис. 3). Также существуют сорбенты, где в качестве матрицы используются другие матрицы, например силикагель, они существенно различаются по таким параметрам, как максимальное давление, ёмкость сорбента. Для успешной очистки белка с His-тагом необходимо производить подбор сорбента, хелатирующего иона, буфера для нанесения и элюции. Широкий выбор металл-хелатных сорбентов позволяет подобрать наиболее подходящую для данного белка схему очистки.



Таблица 1

Сравнение некоторых хелатирующих сорбентов

Производитель	Clontech	GE Healthcare	GE Healthcare	Qiagen
Коммерческое название хелатирующего сорбента	TALON Resin [7]	Chelating sepharose Fast Flow [8]	Chelating sepharose High Performance [9]	Ni-NTA Resin [4]
Матрица	Sepharose 6B-CL (6% highly cross-linked agarose)	6% highly cross-linked agarose	Highly cross-linked spherical agarose, 6%	Sepharose CL-6B
Хелатирующая группа	Carboxymethyl aspartate (CM-Asp)	Confidential [10]	Confidential [10]	nitrilotriacetate (NTA)
Количество координационных связей с ионом металла	4	Confidential [10]	Confidential [10]	3
Диапазон размеров частиц сорбента	45–165 мкм	45–165 мкм	N/D	45–165 мкм
Средний размер частиц сорбента	90 мкм	90 мкм	34 мкм	90 мкм
Емкость колонки (мг белка / мл сорбента)	5–15 мг/мл	~ 40 мг/мл	~ 40 мг/мл	5–10 мг/мл
Максимальное давление	0.02 МПа (0.2 бар, 2.8 psi)	0.1 МПа (1 бар, 14.5 psi)	0.3 МПа (3 бар)	0.02 МПа (0.2 бар, 2.8 psi)

## Литература

1. Tagliavia M. and Nicosia A. Regeneration and Recycling of Supports for Biological Macromolecules Purification. Ch. 24. Current Frontiers and Perspectives in Cell Biology. Edited by Prof. S. Najman. 2012
2. Rogl H., Kosemund K., Kühlbrandt W., Collinson I. Refolding of Escherichia coli produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography. FEBS Lett. 1998. V.432(1-2). P.21-26.
3. Block H., Maertens B., Spriestersbach A., Brinker N., Kubicek J., Fabis R., Labahn J. and Schafer F. Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review. Methods in Enzymology. 2009. V. 463.
4. A handbook for high-expression and purification of 6xHis-tagged proteins. The QIAexpressionist™. Qiagen. 06.2003.
5. Chaga G., Hopp J. and Nelson P.. Immobilized metal ion affinity chromatography on Co<sup>2+</sup> carboxymethylaspartate–agarose Superflow, as demonstrated by one-step purification of lactate dehydrogenase from chicken breast muscle. Biotechnol. Appl. Biochem. 29, 19–24 . 1999
6. Porath J., Olin B. Immobilized metal affinity adsorption and immobilized metal affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. Biochemistry. 1983. P. 1621-1620.
7. TALON® Metal Affinity Resins User Manual. Cat. Nos. Many PT1320-1 (102612). Clontech Laboratories, Inc.
8. Ni Sepharose™ 6 Fast Flow HisPrep™ FF 16/10 HisTrap™ FF. Data file 11-0008-86 AF. GE Healthcare. 08.2014.
9. Ni Sepharose™ High Performance HisTrap™ HP. Data file 18-1174-40 AE. GE Healthcare. 03.2009.
10. Campa M. GE Healthcare's Ni Sepharose 6 Fast Flow. 02.06.2005. biocompare.com

Учебное издание

## МЕТАЛЛ-ХЕЛАТНАЯ АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Учебно-методическое пособие

Составители:

**Охрименко** Иван Станиславович

**Чупин** Владимир Викторович

Редактор *Л. В. Себова*. Корректор *О. П. Котова*

Подписано в печать 01.12.2014. Формат 60 x 84 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Усл. печ. л. 1,5.  
Уч.-изд. л. 1,4. Тираж 50 экз. Заказ 476.

Федеральное государственное автономное образовательное  
учреждение высшего профессионального образования  
«Московский физико-технический институт (государственный университет)»  
141700, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., 9  
+7(495)408-58-22, +7(498)744-65-12 E-mail: rio@mail.mipt.ru

---

Отдел оперативной полиграфии «Физтех-полиграф»  
141700, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., 9  
+7(495)408-84-30 E-mail: polygraph@mipt.ru