

# 金属螯合亲和层析介质用于六聚组氨酸融合蛋白的纯化研究 Preparation of Metal Chelate Affinity Chromatographic Medium and Its Application in the Purification of 6 × Histidine-tagged Protein

李淑娟<sup>1</sup> 孙永亮<sup>2</sup> 胡道道<sup>2</sup> 陈超<sup>1\*</sup> 崔亚丽<sup>1\*</sup>

LI Shu-Juan<sup>1</sup>, SUN Yong-Liang<sup>2</sup>, HU Dao-Dao<sup>2</sup>, CHEN Chao<sup>1\*</sup> and CUI Ya-Li<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 西北大学生物芯片研发中心(暨国家微检测系统工程技术研究中心), 西安 710069

<sup>2</sup> 陕西师范大学化学与材料科学学院, 西安 710062

<sup>1</sup> Biochip Research and Development Center, Northwest University (National Engineering Research Center for Miniaturized Detection System), Xi'an 710069, China

<sup>2</sup> School of Chemistry and Materials Science, Shanxi Normal University, Xi'an 710062, China

**摘要** 以 Sepharose CL-6B 为载体, 环氧氯丙烷为活化剂, 羧甲基天冬氨酸 (CM-Asp) 为螯合配基制备载有  $\text{Co}^{2+}$  的金属螯合亲和层析介质 Co-CM-Asp-Sepharose, 并将其用于六聚组氨酸融合蛋白的纯化研究。对纯化 200  $\mu\text{L}$  细胞裂解液中靶蛋白所需 Co-CM-Asp-Sepharose 介质用量, Co-CM-Asp-Sepharose 与细胞裂解液的孵育时间, 介质清洗条件及靶蛋白洗脱时所需咪唑浓度等进行了优化。比较了 Co-CM-Asp-Sepharose 与 Ni-NTA-Agarose (Qiagen 公司) 两种螯合介质对融合蛋白的纯化效果, 开展了从 5 mL 细胞裂解液中大规模纯化融合蛋白的研究, 并通过 Bradford 法测定了 Co-CM-Asp-Sepharose 对 CD155D1 蛋白的纯化量。结果表明, 对 200  $\mu\text{L}$  细胞裂解液纯化体系, Co-CM-Asp-Sepharose (50% 悬浮液) 的优选体积为 60  $\mu\text{L}$ , 最佳孵育时间为 30 min, 洗脱液最佳咪唑浓度为 200 mmol/L, 纯化得到融合蛋白的量约为 200  $\mu\text{g}$ 。介质用量放大为 1.5 mL (50% 悬浮液) 对 CD155D1 蛋白的纯化量可达 4.6 mg。与商品化 Ni-NTA-Agarose 相比, 本介质具有选择性好, 清洗条件简单, 得到的靶蛋白纯度高等优点。

**关键词** 羧甲基天冬氨酸,  $\text{Co}^{2+}$ , 金属螯合亲和层析, 纯化, 多聚组氨酸融合蛋白

中图分类号 Q51 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)05-0941-06

**Abstract** Using Sepharose CL-6B as support, 3-Chloro-1,2-epoxypropane as activated agent, carboxymethylated aspartate (CM-Asp) as chelating ligand, A chelate affinity chromatographic medium based on  $\text{Co}^{2+}$ , named Co-CM-Asp-Sepharose, was prepared and used to purify 6 × His-tagged fusion proteins. The amount of Co-CM-Asp-Sepharose reacted with 200  $\mu\text{L}$  of lysate, the incubation time, wash condition and the imidazole concentration in the elution buffer were optimized. The purification results using Co-CM-Asp-Sepharose and Ni-NTA-Agarose (product of Qiagen) were compared. The CD155D1 fusion protein was also purified from 5 mL of lysate and the amount of protein was determined by Bradford method. The results show that 60  $\mu\text{L}$  of Co-CM-Asp-Sepharose (50% suspension) was suitable for the protein purification from 200  $\mu\text{L}$  of lysate, the optimal incubation time of medium and lysate was 30 min, the optimal imidazole concentration in the eluting buffer was 200 mmol/L, and 200  $\mu\text{g}$  of fusion protein was obtained. In a big scale experiment, 4.6 mg of fusion protein was obtained from 5 mL of lysate using 1.5 mL of Co-CM-Asp-Sepharose (50% suspension). Compared with Ni-NTA-Agarose, the Co-CM-Asp-Sepharose medium exhibits higher

Received: December 25, 2006; Accepted: February 27, 2007.

This work was supported by a grant from the National High Technology Research and Development Program of China (No. 2005AA205220).

\* Corresponding author. Tel: +86-29-88302427; E-mail: yalicui@nwu.edu.cn; chaochen@lifegen.com

国家高技术研究与发展计划项目(No. 2005AA205220)

selectivity and the protein possesses higher purity.

**Key words** carboxymethylated aspartate,  $\text{Co}^{2+}$ , Metal Chelate Affinity Chromatography, purification,  $6 \times$  histidine-tagged protein

1975年, Porath首次提出固定化金属螯合亲和层析(IMAC), 并发展为一种有效的生化分离技术<sup>[1]</sup>。该方法利用固定在基质上的过渡态金属离子和蛋白质表面的组氨酸、半胱氨酸、色氨酸等残基的配位作用来实现对金属离子有亲和力的蛋白质分离<sup>[2]</sup>。其中, 组氨酸是与金属离子作用较强的氨基酸, 含有多个组氨酸的蛋白质可在IMAC中有效保留, 故多聚组氨酸已成为最常用的蛋白质纯化标签<sup>[3]</sup>。在制备亲和介质时, 常用的金属离子有 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 等, 常用的螯合配基有亚氨基二乙酸(IDA)、三羧甲基乙二胺(TED)、次氨基三乙酸(NTA)等<sup>[4-6]</sup>。用上述螯合配基制备的亲和介质用于融合蛋白的纯化, 有时会出现金属离子脱落、选择性低、蛋白结合能力弱等缺点。为提高纯化效果, 国外研究者提出以羧甲基化的天冬氨酸(CMASP)、羧甲基化的二氨基苯磺酰苯胺(CMDASA)等新型螯合配基来制备IMAC介质, 得到的介质对蛋白结合能力强、选择性强、金属离子不易脱落<sup>[7-9]</sup>。目前, 国内多用IDA、NTA等螯合配基合成IMAC介质并将其用于多聚组氨酸融合蛋白的纯化<sup>[10-15]</sup>, 而用羧甲基化的天冬氨酸作为螯合配基制备IMAC介质及应用研究未见报道。本实验就Co-CM-Asp-Sepharose的制备, 特别是该介质在多聚组氨酸融合蛋白的纯化方面进行了较为系统的研究。

## 1 材料和方法

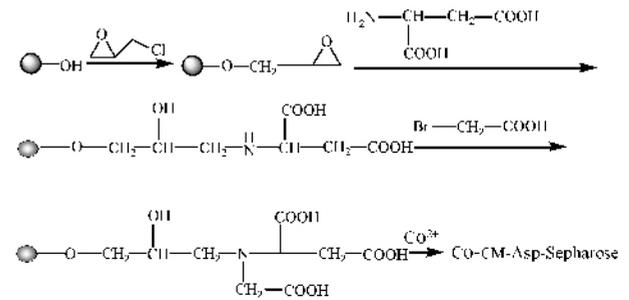
### 1.1 材料、试剂与仪器

工程菌BL21(DE3)-pET-CD155D1(表达人脊髓灰质炎病毒受体CD155D1)第四军医大学免疫学教研室惠赠, BL21(DE3)-pET-gp41(表达艾滋病病毒跨膜蛋白gp41)本实验室构建。低分子量蛋白标准品(14~97kD)为中科院上海生化所产品, Sepharose CL-6B为Pharmacia公司产品, 天冬氨酸为Amresco公司产品, IPTG为北京鼎国产品, Bradford Reagent为Sigma-Aldrich公司产品。环氧氯丙烷、溴乙酸( $\text{BrCH}_2\text{COOH}$ ),  $\text{CoCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 三羟甲基氨基甲烷(Tris),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Urea, 咪唑, NaOH,  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{NaCO}_3$ , Urea, 咪唑等均为国产分析纯试剂。Ni-NTA-Agarose分离介质为Qiagen产品。

8453型紫外分光光度计(Agilent), 5415D型离心机(Eppendorf), DYCZ-24D型双垂直电泳槽(北京六一仪器厂), ZD-85A型恒温振荡器(常州国华电器有限公司), 核酸蛋白分析仪(Eppendorf BioPhotometer), 凝胶成像系统(UVP)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 Co-CM-Asp-Sepharose的制备**: 参照文献<sup>[9]</sup>制备Co-CM-Asp-Sepharose介质, 具体方法: 取一定量Sepharose CL-6B琼脂糖, 分别加入2.5mL环氧氯丙烷, 0.7g的NaOH, 0.06g的 $\text{NaBH}_4$ 和8mL水, 室温搅拌活化10h。滤出活化的琼脂糖, 用10%的 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液清洗一次, 滤干。然后在活化的琼脂糖中分别加入0.335g的NaOH, 0.718g的天冬氨酸, 9.5mL的水及适量的 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 调节pH值为11, 80℃水浴反应4h, 将其滤出洗涤, 抽干。然后加入1.125g NaOH, 15mL水, 3.75g溴乙酸及适量的 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 调节pH值为10, 室温搅拌反应10h, 将其滤出洗涤, 抽干, 接着加入200mmol/L的 $\text{Co}^{2+}$ 溶液, 室温搅拌1h, 过滤、水洗、滤干, 即得到Co-CM-Asp-Sepharose。合成反应的方程式如下:



**1.2.2 六聚组氨酸融合蛋白CD155D1和gp41的诱导表达及细胞裂解液的制备**: 将过夜培养的种子液按常规方法转接, IPTG诱导并在大肠杆菌中进行表达, 离心收获菌体, 按细胞培养液与裂解液体积比10:1(即10mL细胞培养液离心后加入1mL细胞裂解液), 用细胞裂解液A液(100mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10mmol/L Tris, 8mol/L Urea, pH8.0)重悬菌体并裂解细胞, 室温轻摇15~60min至透明状。离心去除细胞碎片, 收集上清备用。

**1.2.3 纯化条件的优化**: 将制备的Co-CM-Asp-Sepharose介质按固液体积比1:1悬浮于20%的乙醇溶液中, 得到50%的Co-CM-Asp-Sepharose悬浮液。

充分摇匀后用移液器移取介质进行条件优化实验。

(1) 不同介质用量对蛋白结合量的影响:分别取 20、40、60、80、100、120  $\mu\text{L}$  的 Co-CM-Asp-Sepharose 悬浮液于 6 支离心管中,用 A 液平衡后各加入含 CD155D1 的细胞裂解液 200  $\mu\text{L}$ ,室温孵育 60min,离心 1min,取不同管的上清用于 SDS-PAGE 分析,观察上清液中剩余蛋白情况。离心后的介质用 A 液、B 液(100mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10mmol/L Tris, 8mol/L Urea, pH 6.3) C 液(100mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10mmol/L Tris, 8mol/L Urea, pH 5.9) 依次清洗后以 100 $\mu\text{L}$  含 250mmol/L 咪唑的 C 液洗脱两次并合并洗脱液。测定洗脱液的  $A_{280}$  值并进行 SDS-PAGE 分析。

(2) 不同孵育时间对蛋白纯化的影响:分别取 60 $\mu\text{L}$  的 Co-CM-Asp-Sepharose 悬浮液于 6 支离心管中,用 A 液平衡后各加入含 CD155D1 的细胞裂解液 200 $\mu\text{L}$ ,室温分别孵育 10、20、30、40、50、60min,离心 1min,弃上清。离心后的介质用 A 液、B 液、C 液依次清洗后以 100 $\mu\text{L}$  含 250mmol/L 咪唑的 C 液洗脱两次,合并洗脱液并测定其  $A_{280}$  值。

(3) 清洗条件的优化:取 60 $\mu\text{L}$  的 Co-CM-Asp-Sepharose 悬浮液于 2 支离心管中,用 A 液平衡后各加入含 CD155D1 的细胞裂解液 200 $\mu\text{L}$ ,室温孵育 30min,离心 1min,取上清用于 SDS-PAGE 分析,观察上清液中剩余蛋白情况。一份介质用 A 液、B 液、C 液依次清洗,另一份介质只用 A 液清洗。然后各加入 100 $\mu\text{L}$  含 250mmol/L 咪唑的 C 液洗脱 2 次,并对 2 次洗脱液进行 SDS-PAGE 分析。

(4) 不同咪唑浓度对蛋白洗脱量的影响:取 60 $\mu\text{L}$  的 Co-CM-Asp-Sepharose 悬浮液于 6 支离心管中,用 A 液平衡后各加入含 CD155D1 的细胞裂解液 200 $\mu\text{L}$ ,室温孵育 30 min,离心 1 min,弃上清。管中介质用 A 液清洗后分别加入 100 $\mu\text{L}$  含 40、80、100、150、200、250mmol/L 咪唑的 C 液洗脱 2 次,合并 2 次洗脱液并测定其  $A_{280}$  值。

**1.2.4 Co-CM-Asp-Sepharose 用于六聚组氨酸融合蛋白大量纯化的初步研究** 根据小量纯化的优化条件,将介质用量放大 25 倍纯化六聚组氨酸融合蛋白,取 50% 的 Co-CM-Asp-Sepharose 悬浮液 1.5mL 于离心管中,用 A 液平衡后加入含 CD155D1 的细胞裂解液 5mL,室温孵育 30min,Co-CM-Asp-Sepharose 悬浮液装入层析柱中,用 A 液洗柱,然后用 5mL 含 200mmol/L 咪唑的 C 液洗脱结合的蛋白,收集洗脱液。用 Bradford 法测定洗脱液中蛋白浓度并计算所

得蛋白总量。

**1.2.5 Co-CM-Asp-Sepharose 与 Ni-NTA-Agarose 的比较**:分别取 50% 的 Co-CM-Asp-Sepharose 悬浮液和 50% 的 Ni-NTA-Agarose 悬浮液 60 $\mu\text{L}$  于 2 支离心管中,用 A 液平衡后各加入含 gp41 的细胞裂解液 200 $\mu\text{L}$ ,室温孵育 30min,离心 1min,取上清用于 SDS-PAGE 分析,观察上清液中剩余蛋白情况。Co-CM-Asp-Sepharose 介质用 A 液清洗,Ni-NTA-Agarose 按产品要求以 A 液、B 液、C 液依次清洗,在离心管中各加入 100 $\mu\text{L}$  含 200mmol/L 咪唑的 C 液洗脱两次,并对两次洗脱液进行 SDS-PAGE 分析。

## 2 结果和讨论

### 2.1 不同介质用量对蛋白结合量的影响

为确定纯化 200 $\mu\text{L}$  细胞裂解液中 CD155D1 所需的 Co-CM-Asp-Sepharose 最适量,取不同体积 Co-CM-Asp-Sepharose(50% 悬浮液)分别与 200 $\mu\text{L}$  细胞裂解液孵育。对纯化后的剩余溶液和洗脱液进行 SDS-PAGE 分析,结果如图 1 所示,随着介质用量的增加,剩余溶液中分子量为 39kD 的六聚组氨酸融合蛋白 CD155D1 的量逐渐减少,介质用量为 20 $\mu\text{L}$ 、40 $\mu\text{L}$ 、60 $\mu\text{L}$  时,剩余溶液中 CD155D1 的量呈明显减少趋势,当介质用量为 80 $\mu\text{L}$ 、100 $\mu\text{L}$ 、120 $\mu\text{L}$  时,剩余溶液中 CD155D1 的量变化不再明显。对洗脱得到 CD155D1 蛋白溶液在 280 nm 处的吸光度测定结果见图 2 所示,随介质用量的增加,洗脱得到 CD155D1 的量逐渐增加并趋于稳定,当介质用量大于 60 $\mu\text{L}$  时,洗脱得到 CD155D1 的量几乎不变。表明 60 $\mu\text{L}$  体积的 Co-CM-Asp-Sepharose(50% 悬浮液)足够用以结合并纯化 200 $\mu\text{L}$  细胞裂解液中的 CD155D1 蛋白。

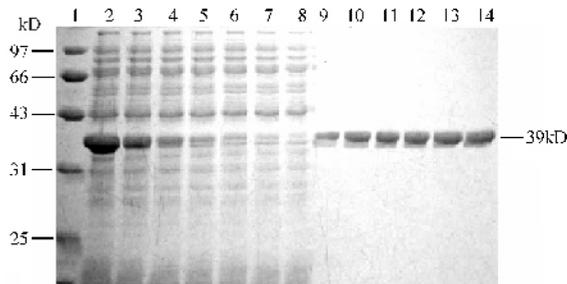


图 1 不同介质用量纯化后剩余溶液及洗脱液中蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of proteins in supernatant and eluate after purification with different volume of medium

1: protein marker; 2: crude lysate; 3~8: supernatant after purification with 20, 40, 60, 80, 100, 120 $\mu\text{L}$  of Co-CM-Asp-Sepharose respectively; 9~14: eluate from 20, 40, 60, 80, 100, 120 $\mu\text{L}$  of Co-CM-Asp-Sepharose respectively.

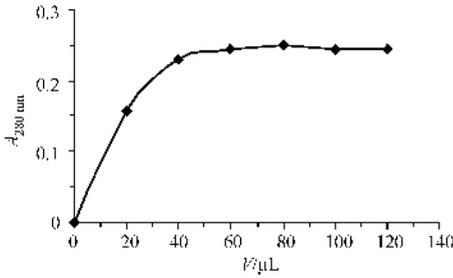


图2 不同介质用量与洗脱液中融合蛋白在280nm吸光度值的关系

Fig. 2 The relation of different volume of medium and the absorbance of fusion protein in different eluate at 280nm

### 2.2 不同孵育时间对蛋白纯化的影响

为确定 Co-CM-Asp-Sephacrose 与六聚组氨酸融合蛋白的最佳结合时间,6份体积为 60 $\mu$ L 的 Co-CM-Asp-Sephacrose 悬浮液分别与 200 $\mu$ L 含 CD155D1 的细胞裂解液孵育不同时间。经清洗洗脱后测定洗脱液  $A_{280}$  值以分析所纯化得到 CD155D1 的量。由图 3 可知,10min 孵育即可纯化得到大部分的六聚组氨酸融合蛋白,30min 内纯化量已经达到饱和,说明该介质可较快与六聚组氨酸融合蛋白结合,实验中优选的孵育时间为 30min。

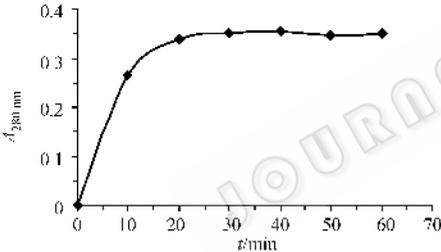


图3 不同孵育时间与洗脱液中融合蛋白在280nm吸光度值的关系

Fig. 3 The relation of different incubation time and the absorbance of fusion protein in different eluate at 280nm

### 2.3 清洗条件的优化

现有金属螯合亲和层析介质在应用中多用 pH 梯度清洗,本实验以简单清洗的方法与传统的 pH 梯度清洗进行了比较,取两份体积为 60 $\mu$ L 的 Co-CM-Asp-Sephacrose 悬浮液分别与 200 $\mu$ L 含 CD155D1 的细胞裂解液孵育,采用两种清洗方法分别对介质进行清洗,对纯化后的剩余溶液和洗脱液进行 SDS-PAGE 分析,结果如图 4 所示。从图 4 可知,用 A 液(pH 8.0)、B 液(pH 6.3)、C 液(pH 5.9)各清洗一次和只用 A 液清洗一次在洗脱条带中看不出差别,表明该介质在纯化时就无需 pH 梯度清洗,用 A 液清洗即可。这样不仅减少了洗脱重组蛋白之前的繁琐洗涤过程,也减少了介质的损失。

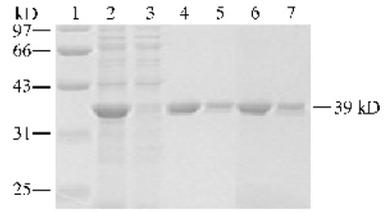


图4 不同条件清洗介质后剩余溶液及洗脱液中蛋白的 SDS-PAGE

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of proteins in supernatant and eluate under different washing conditions

1: Protein marker; 2: crude lysate; 3: supernatant; 4~5: eluate from Co-CM-Asp-Sephacrose after washing by buffer A, B, C; 6~7: eluate from Co-CM-Asp-Sephacrose after washing by buffer A.

### 2.4 不同咪唑浓度对蛋白洗脱量的影响

对金属螯合亲和层析介质上结合的带有六聚组氨酸标签的融合蛋白常用低 pH 值(pH 4~5)或含咪唑的溶液进行洗脱,低 pH 可减弱蛋白和金属离子的相互作用,使六聚组氨酸融合蛋白得以洗脱,而咪唑是竞争性取代剂,可置换结合在介质上的六聚组氨酸融合蛋白,较低的 pH 和咪唑互相配合可更好地使六聚组氨酸融合蛋白被洗脱。在中性和弱碱性条件下六聚组氨酸标签的咪唑侧链和 Co-CM-Asp-Sephacrose 上的  $Co^{2+}$  配位形成复合物,从而保留在介质上,因而本实验以 C 液(pH 5.9)和咪唑联合洗脱,为确定最佳咪唑浓度,取 6 份体积为 60 $\mu$ L 的 Co-CM-Asp-Sephacrose 悬浮液分别与 200 $\mu$ L 含 CD155D1 的细胞裂解液孵育。经 A 液清洗,分别以不同浓度咪唑的洗脱剂洗脱后测定洗脱液的  $A_{280}$  值,结果如图 5 所示。从图 5 可知,随着咪唑浓度的增大,洗脱得到六聚组氨酸融合蛋白的量增多,当咪唑浓度为 150mmol/L 时,大部分融合蛋白被洗脱,当咪唑浓度大于 200mmol/L 时洗脱液中融合蛋白的含量基本保持恒定,说明结合的融合蛋白几乎全被洗脱,因此,选用 C 液(pH 5.9)和 200mmol/L 的咪唑作为系统优选的洗脱剂。

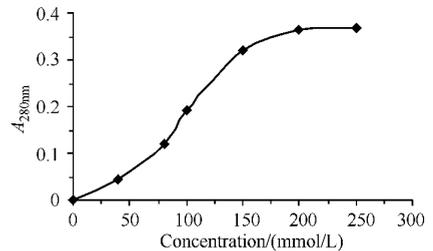


图5 不同咪唑浓度与洗脱液中融合蛋白在280nm吸光度的关系

Fig. 5 The relation of different imidazole concentration and the absorbance of fusion protein in different eluate at 280nm

在 2.1~2.4 步骤优化条件下,通过 280nm 吸光

度测定结果可粗略计算:200 $\mu$ L裂解液纯化后所得CD155D1融合蛋白量约为200 $\mu$ g。

## 2.5 Co-CM-Asp-Sepharose 用于六聚组氨酸融合蛋白大量纯化的初步研究

根据小量纯化的优化条件,将介质体积放大25倍纯化六聚组氨酸融合蛋白CD155D1,取50%的Co-CM-Asp-Sepharose悬浮液1.5mL与5mL含CD155D1的细胞裂解液孵育,Co-CM-Asp-Sepharose悬浮液装入层析柱中,洗柱后用5mL含200mmol/L咪唑的C液洗脱蛋白,收集洗脱液5mL。用Bradford法测定蛋白浓度并计算可知蛋白质总量为4.6mg。

## 2.6 Co-CM-Asp-Sepharose 与 Ni-NTA-Agarose 的比较

将Co-CM-Asp-Sepharose与商品化Ni-NTA-Agarose进行蛋白纯化的比较,取50%的Co-CM-Asp-Sepharose悬浮液和50%的Ni-NTA-Agarose悬浮液各60 $\mu$ L分别与200 $\mu$ L含六聚组氨酸融合蛋白gp41(分子量36kD)的细胞裂解液孵育,并按各自清洗溶液对介质清洗后洗脱蛋白,对纯化后的剩余液和洗脱液进行SDS-PAGE,结果如图6所示。从图6中可看出经Co-CM-Asp-Sepharose与Qiagen公司的Ni-NTA-Agarose介质纯化后剩余液中蛋白质的组成几乎一样,洗脱得到gp41蛋白的量相当,说明两者蛋白结合容量差别不大。但是,以Ni-NTA-Agarose纯化后的洗脱液电泳结果中可见有少量杂蛋白的条带,而且与Co-CM-Asp-Sepharose相比,Ni-NTA-Agarose介质纯化后剩余液泳道中杂蛋白减少较多,说明有较多的杂蛋白非特异性结合到Ni-NTA-Agarose介质上,便影响了纯化后所得蛋白的纯度。这与文献中报道含镍螯合介质可与不含六个组氨酸残端的蛋白结合,因而会表现出一定非特异性吸附的结果一致<sup>[16]</sup>。而以Co-CM-Asp-Sepharose纯化的洗脱液电泳条带中不存在杂蛋白,可见Co-CM-Asp-Sepharose对融合蛋白选择性高,非特异性吸附降低,因而表现出较好的纯化效果。

以羧甲基天冬氨酸为配基制备的Co-CM-Asp-Sepharose能牢固地结合金属离子从而有效防止了金属离子的泄漏,将Co-CM-Asp-Sepharose用于纯化六聚组氨酸融合蛋白CD155D1和gp41的结果表明,该介质可大规模纯化蛋白,通用性较好,对蛋白结合选择性高,蛋白结合速度快,与现有商品化Ni-NTA-Agarose相比,具有可简单清洗、洗脱得到的蛋白纯度高特点。

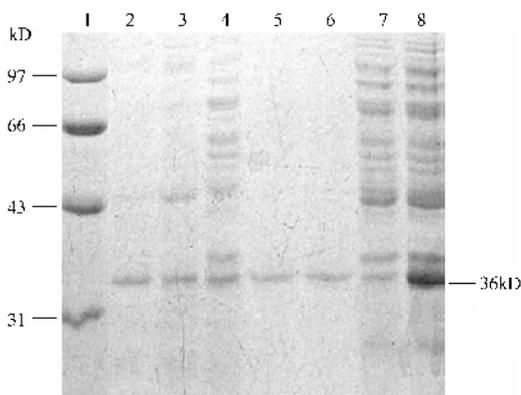


图6 SDS-PAGE对Co-CM-Asp-Sepharose和Ni-NTA-Agarose纯化融合蛋白的结果比较

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of proteins after purification using Co-CM-Asp-Sepharose and Ni-NTA-Agarose separately  
1: protein marker; 2, 3: eluate from Ni-NTA-Agarose; 4: supernatant using Ni-NTA-Agarose; 5, 6: eluate from Co-CM-Asp-Sepharose; 7: supernatant using Co-CM-Asp-Sepharose; 8: crude lysate.

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Porath J, Carlsson J, Olsson I, et al. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 1975, **258**(5536): 598-599.
- [2] Tie K(铁锋), Ru Q(茹刚), Li LY(李令媛), et al. Purification of metallothionein with metal chelate affinity chromatography. *Progress Biochemistry and Biophysics(生物化学与生物物理进展)*, 1994, **21**(5): 447-450.
- [3] Janknecht R, de Martynoff G, Lou J, et al. Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**(20): 8972-8976.
- [4] Porath J, Olin B. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials: serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. *Biochemistry*, 1983, **22**(7): 1621-1630.
- [5] Hochuli E, Dobeli H, Schacher A. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighboring histidine residues. *Journal of Chromatography*, 1987, **411**: 177-184.
- [6] Porath J. Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expression and Purification*, 1992, **3**(4): 263-281.
- [7] Mantovaara T, Pertoft H, Porath J. Purification of factor V III: c coagulant activity from rat liver nonparenchymal cell culture medium by immobilized metal ion affinity chromatography. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1991, **13**(1): 315-322.
- [8] Wong JW, Albright RL, Wang NLL. Immobilized metal ion affinity chromatography(IMAC)-chemistry and bioseparation application. *Separation and Purification Methods*, 1991, **20**(1): 49-106.
- [9] Nelson PS, Yang TT, Kain SR, et al. US Patent, 6242581, 2001-06-05.
- [10] Pan F(潘飞), Qiu YL(邱雁临). Purification of reduced glutathione by immobilized metal ion affinity chromatography. *Chinese Journal of Pharmaceuticals(中国医药工业杂志)*, 2006,

- [ 11 ] Zhang YH( 张亚辉 ), Yang YJ( 杨严俊 ). Study on the purification of functional proteins from egg white by cellulose metal-chelated affinity membrane. *Journal of Food Science and Biotechnology*( 食品与生物技术学报 ), 2006, **25**( 2 ): 43 - 47.
- [ 12 ] Liu JR( 刘建荣 ), Liu JG( 刘建国 ), Zhao XY( 赵晓瑜 ), *et al.* Purification and renaturation of recombinant human Cu, Zn-SOD by metal-chelating affinity chromatography. *Chinese Journal of Biotechnology*( 生物工程学报 ), 2005, **21**( 6 ): 993 - 997.
- [ 13 ] Liu LI( 刘琳琳 ), Zeng LX( 曾力希 ), Liu T( 刘婷 ), *et al.* Oriented immobilization of papain on metal chelating carriers. *Chinese Journal of Biotechnology*( 生物工程学报 ), 2005, **21**( 5 ): 789 - 793.
- [ 14 ] Wang XJ( 王晓军 ), Fan DD( 范代娣 ). Purification of recombinant human-like collagen by using metal chelated affinity chromatography. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities*( 高校化学工程学报 ), 2005, **19**( 3 ): 410 - 413.
- [ 15 ] Zhang H( 张怀 ), Yuan QP( 袁其朋 ), Zhu YP( 朱亚平 ), *et al.* Purification of recombinant hepcidin fusion protein by immobilized metal ion affinity chromatography. *Journal of Beijing University of Chemical Technology*( 北京化工大学学报 ), 2005, **32**( 6 ): 15 - 19.
- [ 16 ] Kasher MS, Wakulchik M, Cook JA, *et al.* One-step purification of recombinant human papillomavirus type 16E7 oncoprotein and its binding to the retinoblastoma gene product. *Biotechniques*, 1993, **14**( 4 ): 630 - 641.