

# 产品 Ni-Smarbon 6FF

## 产品描述

Ni-Smarbon 6FF是一种以新型IMAC为填料的预装柱,螯合有非常牢固的Ni离子,主要应用于组氨酸标记蛋白的捕获和纯化,可以在含有EDTA及DTT的情况下进行目的蛋白的高效纯化。Ni-Smarbon 6FF洗脱杂蛋白推荐咪唑浓度在0—5mM。预装柱具有标准接口,可以适配商品化的各类中压色谱系统,如AKTA等,方便客户操作。

试剂种类	耐受时间
0.01M HCl, 0.01 M NaOH	1周
10mM EDTA, 1M NaOH, 5mM TCEP, 20 mM β-巯基乙醇, 6 M Gu-HCl	24小时
500mM 咪唑, 100 mM EDTA	2小时
30% isopropanol	20分钟

## 纯化流程

### 1. 缓冲液的准备

可使用下列推荐缓冲液,也可根据自己的使用习惯配置不同的缓冲液体系,基本原理就是低咪唑上样,高咪唑洗脱。

#### a. 可溶性组氨酸标签蛋白纯化所需缓冲液

Lysis Buffer: 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, pH 8.0

Wash Buffer: 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 0-5 mM imidazole, pH 8.0

Elution Buffer: 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0

#### b. 包涵体组氨酸标签蛋白纯化所需缓冲液

Lysis Buffer: 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 8 M Urea, pH 8.0

Wash Buffer: 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 8 M Urea, 0-5 mM imidazole, pH 8.0

Elution Buffer: 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 8 M Urea, 250 mM imidazole, pH 8.0

### 2. 样品准备

将菌体破碎离心,取上清

### 3. 样品纯化

(1) 将泵管道中注满去离子水。去掉上塞子,将层析柱连接至色谱系统中。再折断下口,将预装柱接到色谱系统中,并旋紧。

(2) 用3-5倍柱体积的去离子水冲洗出存储缓冲液。

(3) 使用至少5倍柱体积的平衡液平衡色谱柱。5ml 预装柱推荐流速为5 ml/min。

(4) 利用样品泵或样品环上样。

(5) 用洗杂液冲洗柱子,直到紫外吸收达到一个稳定的基线(一般至少10-15个柱体积)。

(6) 用洗脱液采用等度或线性梯度洗脱。等度洗脱中,通常5倍柱体积洗脱液就足够了。

梯度洗脱可以用20倍柱体积或更多,来分离不同结合强度的蛋白质。

(7) 依次使用3倍柱体积的平衡液和5倍柱体积的去离子水平衡填料,最后再用5倍柱体积的20%的乙醇平衡,然后保存在20%的乙醇中,置于2-8°C,防止填料被细菌污染。

### 4. SDS-PAGE检测

将使用纯化产品得到的样品(包括流出组分、洗杂组分和洗脱组分)以及原始样品使用SDS-PAGE 检测纯化效果。

## 在位清洗

当填料使用过程中发现反压过高或者填料上面出现明显的污染时,需要进行在位清洗操作 (Cleaning- in-Place,CIP)。建议按照下面操作去除填料上残留的污染物,如沉淀蛋白、疏水蛋白和脂蛋白等。

### a. 去除强疏水结合的蛋白,脂蛋白和脂类

方案一:使用30%异丙醇清洗5-10个柱体积,接触时间为15-20 min 可以去除此类污染物。然后,再使用10倍柱体积的去离子水清洗。

方案二:使用含有0.1-0.5%非离子去污剂的0.1M 醋酸溶液,接触时间为1-2 h。去污剂处理后,需要使用70%的乙醇清洗5个柱体积,以彻底去除去污剂。最后使用10倍柱体积的去离子水清洗。

方案三:使用0.1M 或0.5M NaOH 溶液冲洗填料3个柱体积,然后用10-15倍柱体积的去离子水清洗。

### b. 去除离子作用结合的蛋白

使用1.5 M NaCl溶液清洗10-15 min。然后,再使用去离子水清洗10个柱体积。

清洗好的柱子可再用20%乙醇冲洗2个柱体积,置于2-8°C保存。

## 问题及解决方案

问题	原因	推荐的解决方案
柱子反压过高	填料被堵塞	对填料进行在位清洗 裂解液中含有微小的固体颗粒,建议上柱前使用滤膜(0.22或0.45μm)过滤,或者离心去除。
	样品太粘稠	样品中含有高浓度的核酸,加长破碎时间直至粘度降低。
	缓冲液太粘稠	有机溶剂或者蛋白稳定试剂(如甘油等)可能会引起反压增高,降低操作流速。
洗脱组分中 没有目的蛋白	样品中无His标签蛋白	采用Western Blotting等确定样品中是否含有目的蛋白。
	表达量太低	优化表达条件。
	目的蛋白结合比较弱,在洗杂步骤被洗下来了	提高洗杂液的pH,或者降低咪唑浓度。
	目的蛋白结合过强,不容易洗脱下来	降低洗脱液的pH值,或者增加洗脱液中咪唑浓度。
蛋白降解		在4°C下进行纯化操作 菌体破碎时添加一些蛋白酶抑制剂。
	洗杂操作不彻底	增加洗杂液体积。
(含有多种蛋白)	洗杂组分不纯	增加洗杂液体积。
	样品中含有其他的组氨酸标签蛋白	通过调节pH值,或者咪唑浓度来优化洗杂条件。再使用其他的纯化手段(如离子交换,疏水等)进一步纯化洗脱组分。
上样过程中 蛋白发生沉淀	操作温度太高	4°C下进行上样。
	蛋白发生聚集	在样品和所有的缓冲液中添加稳定剂,如0.1%的Triton X-100或者Tween-20。