



# HiSelect Ni Smart HF

## 目录

|              |   |
|--------------|---|
| 1. 产品介绍      | 1 |
| 2. 纯化流程      | 2 |
| 3. 在位清洗      | 3 |
| 4. 问题及解决方案   | 3 |
| 5. 订购信息及相关产品 | 3 |

## 1. 产品介绍

**Ni Smart Beads HF** 是一种新型 IMAC 填料，螯合有非常牢固的 Ni 离子，具体性能见表 1。**Ni Smart Beads HF** 主要应用于分泌到真核培养液上清中的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高效的纯化。该介质同样能够应用于各种表达系统胞内表达蛋白的纯化，而且其选择性更高，纯化获得的目的蛋白纯度更好。**Ni Smart Beads HF** 有很强的组分兼容性，适用于广泛底物及盐浓度的缓冲条件，试剂耐受情况见表 2。

**HiSelect Ni Smart HF** 是一种中压预装柱，填充 4.7 ml 的 **Ni Smart Beads HF** 介质。柱管由生物相容性聚丙烯制成，不与生物分子相互作用。柱管两头都有堵头，防止保护液的泄露。柱体标签上的箭头表示推荐的流向。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 ÄKTA 等，方便客户操作

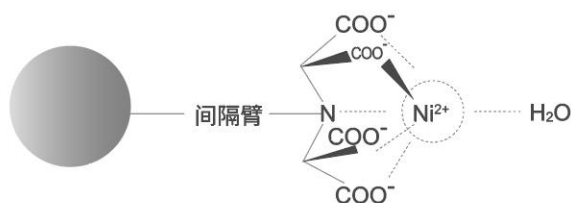


图 1. Ni Smart Beads HF 化学结构示意图

表 1. HiSelect Ni Smart HF 产品信息

| 项目          | 性能                                    |
|-------------|---------------------------------------|
| 基质          | 高流速琼脂糖微球                              |
| 离子载量        | 15-25 $\mu\text{mol Ni}^{2+}$ / mL 介质 |
| 微球粒径        | 85-95 $\mu\text{m}$                   |
| 最大压力        | 0.3 MPa, 3 bar                        |
| 流速*         | $\leq 600\text{cm/h}$                 |
| 储存缓冲液       | 20%乙醇 (2%苯甲醇可选)                       |
| 储存温度        | 2-8 $^{\circ}\text{C}$                |
| 柱尺寸 (内径×高度) | 0.77×10 cm                            |

\*: 层析柱 50×500 mm，柱高 25 cm，25 $^{\circ}\text{C}$  去离子水在 0.3 MPa 时的线性流速。

表 2. HiSelect Ni Smart HF 试剂耐受情况

| 试剂种类                                                                                    | 耐受时间     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| 0.01 M HCl, 0.01 M NaOH                                                                 | 1 week   |
| 10 mM EDTA, 1 M NaOH, 5 mM DTT, 5 mM TCEP,<br>20 mM $\beta$ -mercaptoethanol, 6M Gu-HCl | 24 hours |
| 500 mM imidazole, 100 mM EDTA                                                           | 2 hours  |
| 30% isopropanol                                                                         | 20 min   |

## 2. 纯化流程

### 2.1 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，或者高 pH 上样，低 pH 洗脱。缓冲液在使用前最好用 0.22  $\mu\text{m}$  或者 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤。因为 **HiSelect Ni Smart HF** 可以用于可溶蛋白和包涵体蛋白的纯化，两种方法所需缓冲液不同，具体配置方法如下：





### 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, pH8.0

Wash Buffer: 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 0-5 mM imidazole, pH8.0

Elution Buffer: 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH8.0

### 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, pH8.0

Wash Buffer: 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 8 M Urea, 0-5 mM imidazole, pH8.0

Elution Buffer: 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 8 M Urea, 250 mM imidazole, pH8.0

**注:** 为了减少宿主细胞蛋白的结合, 建议在 Wash Buffer 中加入低浓度的咪唑。

为了消除一些离子作用蛋白的吸附, 可以在溶液中加入 0.5-1.0 M NaCl。

低 pH 洗脱会增加洗脱体积, 请按需求进行选择。

## 2.2 样品准备

### 2.2.1 细菌或酵母表达的蛋白

- 1) 挑取单菌落到培养基中, 根据载体使用说明加入相应浓度的诱导剂诱导相应的时间。
- 2) 表达结束后, 将培养液转移到离心杯中, 7,000 rpm(7,500×g), 离心 15 min 收集菌体, 然后按照菌体: Lysis Buffer=1: 10 (W/V) 加入 Lysis Buffer, 加入终浓度为 1 mM 的 PMSF。加入溶菌酶 (工作浓度为 0.2-0.4 mg/ml, 如果表达的宿主细胞内含 pLysS 或 pLysE, 可以不加溶菌酶), (同时也可加入其他蛋白酶抑制剂, 但不能影响目的蛋白与介质的结合)。
- 3) 将菌体沉淀悬浮起来, (如果菌液浓度高, 也可考虑加入 10 µg/ml RNase A 和 5 µg/ml DNase I), 混匀, 放置于冰上, 然后冰上超声破碎细胞, 至菌液基本保持澄清。
- 4) 将澄清的破碎液转移至离心管中, 10,000 rpm(15,000×g), 4℃ 离心 20-30 min。取上清, 置于冰上备用或 -20℃ 保存。

### 2.2.3 包涵体蛋白纯化 (变性条件)

- 1) 将培养液转移到离心杯中, 7,000 rpm(7,500×g), 离心 15 min 收集菌体, 去掉上清。
- 2) 按照菌体:Lysis buffer (不含 8 M 尿素或 6 M 盐酸胍) =1:10(W/V)将菌体悬浮起来混匀, 冰浴超声破碎。
- 3) 将破碎液转移至离心管中, 10,000 rpm(15,000×g), 4℃ 离心 20-30 min。去掉上清, 步骤 2) 和 3) 可以重复一次。
- 4) 按照菌体:Lysis buffer (含 8M 尿素) =1:10(W/V)将包涵体悬浮起来。
- 5) 变性条件下进行 His 标签蛋白纯化。

### 2.2.2 酵母、昆虫和哺乳细胞等真核细胞分泌表达可溶性蛋白

- 1) 将细胞培养液转移至离心杯, 7,000 rpm (7,500×g), 离心 15 min 取上清。
- 2) 样品中含有可耐受范围内试剂, 不需要透析或浓缩, 可以直接上样。

**注:** 所有样品在过柱前, 可以用 0.22 µm 或者 0.45 µm 滤膜过滤, 防止柱子堵塞。

## 2.3 样品纯化

**HiSelect Ni Smart HF** 是一种用于组氨酸标签蛋白纯化的预装柱产品, 可以用各种常规的中压色谱系统, 以 ÄKTA 仪器使用为例介绍使用方法。

- 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。1 ml 预装柱推荐流速为 1 ml/min, 5ml 预装柱推荐流速为 5 ml/min。
- 4) 利用样品泵或样品环上样。

**注:** 样品的粘度增加使得即使上样体积很少, 也会导致层析柱很大的反压。上样量不要超过柱子的结合能力。大量的样品体积也可能造成很大的反压, 使得进样器更难使用。

- 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)。注: 在样品和结合缓冲液中加入咪唑可以提高样品纯度。
- 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 倍柱体积的储存缓冲液平衡, 然后保存在储存缓冲液中, 置于 2-8℃, 防止填料被细菌污染。

## 2.4 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。





### 3. 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。

#### 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 0.1 M 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。

#### 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储存缓冲液冲洗 2 个柱体积，置于 2-8℃ 保存。

### 4. 问题及解决方案

| 问题             | 原因分析                 | 推荐解决方案                                                                                         |
|----------------|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 柱子反压过高         | 填料被堵塞                | 按照第 3 部分对填料进行在位清洗。<br>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 0.45 μm）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，或者添加 DNase I（终浓度 5 μg/ml），Mg <sup>2+</sup> （终浓度 1 mM），冰上孵育 10-15 min。 |
|                | 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。                                                                      |
| 洗脱组分不纯（含有多重蛋白） | 蛋白降解                 | 在 4℃ 下进行纯化操作。<br>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。                                                                                       |
|                | 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℃ 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。                                            |

### 5. 订购信息及相关产品

| 名称             | 货号       | 规格       |
|----------------|----------|----------|
| HiSelect Ni HF | SA110C47 | 1×4.7 ml |
| HiPur Ni HF    | SA110C20 | 1×20 ml  |

