



HisPur Ni Smart Kit

目录

1. 产品介绍.....	1
2. 纯化流程.....	1
3. 在位清洗.....	2
4. 问题及解决方案.....	2
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 2。**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 3。

HisPur Ni Smart Kit 提供了 1ml 的 **Ni Smart Beads HF** 重力柱，Ni Smart 平衡液粉包、Ni Smart 洗杂液粉包、Ni Smart 洗脱液粉包各一包。不需要再进行填料填装和试剂配置，方便客户使用，操作简单，纯化效率高。试剂盒详细组分见表 1。

表 1. HisPur Ni Smart Kit 组分

组分名称	规格	数量
Ni Smart Beads HF 重力柱	1 ml	5
镍柱平衡液粉包 (Ni-Smart, 1L)	1L	1
镍柱洗杂液粉包 (Ni-Smart, 1L)	1L	1
镍柱洗脱液粉包 (Ni-Smart, 0.5L)	0.5L	1
流速控制器	1 套	5

表 2. Ni Smart Beads 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 $\mu\text{mol Ni}^{2+}/\text{ml}$ 介质
平均粒径范围	85-95 μm
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	4-30 $^{\circ}\text{C}$

表 3. Ni Smart Beads 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, 20 mM β -mercaptoethanol, 6M Gu-HCl	24 hours
500mM imidazole, 100 mM EDTA	2 hours
30% isopropanol	20 min

2. 纯化流程

2.1 缓冲液准备

- 1) Ni Smart 平衡液粉包和 Ni Smart 洗杂液粉包分别用纯水溶解定容至 1L 备用。
- 2) Ni Smart 洗脱液粉包用纯水溶解定容至 0.5L 备用。
- 3) 当纯化后杂蛋白较多时，可以尝试不同咪唑梯度洗杂。下表为常用的咪唑洗杂梯度以及试剂配制方法，可作为参考。





表 4. 优化洗杂条件配置方法

组分	5mM 咪唑洗杂	10mM 咪唑洗杂	20mM 咪唑洗杂	30mM 咪唑洗杂	40mM 咪唑洗杂
Ni Smart 洗杂液	100ml	98.0ml	93.9ml	89.8ml	85.7ml
Ni Smart 洗脱液	0ml	2.0ml	6.1ml	10.2ml	14.3ml

缓冲液在使用前最好用 0.22 μ m 或者 0.45 μ m 滤膜过滤。

2.2 样品准备

2.2.1 细菌表达的蛋白

- 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 $\times$ g), 离心 15 min 收集菌体, 然后按照菌体: Ni Smart 平衡液=1: 10 (W/V) 加入 Ni Smart 平衡液, 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 μ g/ml RNase A 和 5 μ g/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 $\times$ g), 4 $^{\circ}$ C 离心 20-30 min。取上清, 置于冰上备用或-20 $^{\circ}$ C 保存。

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 $\times$ 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 μ m 或者 0.45 μ m 滤膜过滤, 防止柱子堵塞。样品在上样前建议离心或用 0.22 μ m 或 0.45 μ m 滤膜过滤, 减少杂质, 提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

2.3 样品纯化

HisPur Ni Smart Kit 不要再进行填料填装, 缓冲液配置非常简单, 整个纯化流程大约需要 40 min (主要取决于样品体积和溶液的粘稠性), 操作快捷。使用时参考下面操作说明。

- 4) HisPur Ni Smart Column 固定在铁架台上, 依次去掉下端塞和上端塞, 流干重力柱的保护液。

- 5) 向柱管中加入 5 ml Ni Smart 平衡液平衡柱子, 流干后, 再重复 2 次, 共使用 15 ml Ni Smart 平衡液。

- 6) 将处理好的样品加入柱管, 重力上样, 收集流出液, 用于 SDS-PAGE 分析蛋白质的结合情况。

注: 试剂盒中配套流速控制器, 当样品过柱流速较快时, 可以将流速控制器连接在柱子下端, 控制上样流速。

- 7) 上样结束后推荐先用 5 ml Ni Smart 平衡液进行一次洗杂。

- 8) 向柱管中加入 5 ml Ni Smart 洗杂液, 进行洗杂, 去除非特异性吸附的杂蛋白, 收集洗杂液, Ni Smart 洗杂液流干后, 再重复 5 次, 共使用 30 ml Ni Smart 洗杂液。

- 9) 也可以根据表 4 配置其他咪唑浓度的洗杂液进行梯度洗杂, 选择合适的咪唑浓度, 每个浓度清洗 5-10 ml 并收集洗杂流出液。

- 10) 使用 5-10 ml 的 Ni Smart 洗脱液进行洗脱目的蛋白, 分段收集, 每 2 ml 收集一管, 分别检测, 这样既可以保证所有结合的目的蛋白被洗脱, 又可以得到高纯度和高浓度的蛋白。

- 11) 依次使用 5 ml Ni Smart 平衡液和 5ml 去离子水交替冲洗填料, 重复 2 次, 最后再用 5 ml 20% 的乙醇冲洗填料, 使用下柱头封闭柱子下端后, 再向柱子内加入足量的 20% 乙醇, 然后封闭上柱头, 置于 2-8 $^{\circ}$ C 保存, 防止填料被细菌污染。

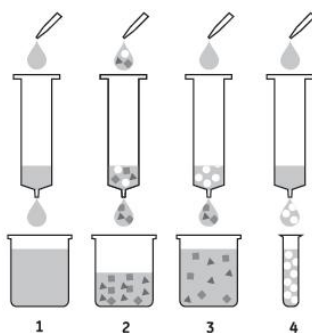


图 1. 使用 HisPur Ni Smart Column 纯化蛋白流程

Step 1: 柱子平衡; Step 2: 上样; Step 3: 洗杂; Step 4: 洗脱

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载量和流速都降低, 或者填料上面出现明显的污染时, 需要进行清洗操作。

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

- 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。
- 使用含有去污剂的酸性或碱性溶液, 清洗填料 2 倍柱体积。例如, 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。
- 使用 0.1 M 或 0.5 M 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 20% 乙醇冲洗 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
柱子流速慢	填料被堵塞	按照第3部分进行介质清洗。
		缓冲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。
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	采用 Ni Smart 平衡液作为第一个洗杂梯度。
	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℃ 下进行纯化操作。 菌体破碎时添加一些蛋白酶抑制剂。
洗脱组分不纯 (含有多重蛋白)	洗杂操作不彻底	增加 Wash Buffer 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, 咪唑浓度调节可以参考表 4。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
HisPur Ni Smart Kit	SA110K	5 次
Ni Smart Beads HF 重力柱	SA110GC01	1ml
镍柱平衡液粉包 (Ni-Smart, 1L)	SLB046	1L
镍柱洗杂液粉包 (Ni-Smart, 1L)	SLB047	1L
镍柱洗脱液粉包 (Ni-Smart, 0.5L)	SLB048	0.5L
流速控制器	SLM142	1 个
Ni Smart Beads HF	SA110005	5 ml
	SA110025	25 ml
	SA110100	100 ml
	SA110500	500 ml
	SA11001L	1 L
	SA11010L	10 L

