

Version: 02
Update: 09/30/2022

High Affinity Ni-TED Resin FF Cat. No.: L00885

目录

1. 产品介绍	1
2. 纯化步骤	2
2.2 准备样品	2
2.3 纯化样品	3
2.4 SDS-PAGE 检测	3
3. 在位清洗	4
4. 问题及解决方案	4

1. 产品介绍

High Affinity Ni-TED Resin FF 是一款新型的固定化金属螯合层析 (IMAC) 填料, 其表面螯合有非常牢固的 Ni 离子, 具体性能见表 1。High Affinity Ni-TED Resin FF 可用于分泌到真核培养液上清中的组氨酸蛋白捕获和纯化, 特别适用于含有一定浓度的 EDTA 及 DTT 的溶液体系。与其它螯合 Ni 离子的填料相比, High Affinity Ni-TED Resin FF 具有更强的兼容性, 在常见的试剂中 Ni 离子的脱落极低。High Affinity Ni-TED Resin FF 的试剂耐受性见表 2。

表 1. High Affinity Ni-TED Resin FF 产品性能

	High Affinity Ni-TED Resin FF
基质	交联的 6%琼脂糖微球
粒径	45~165 um
载量	≥10 mg/ml 6xHis-tagged protein (43KD)
最大压力	0.3 MPa, 3 bar
推荐流速	150-600cm/h
储存溶液	20%乙醇
储存温度	2~8°C

表 2. High Affinity Ni-TED Resin FF 试剂耐受情况

试剂种类	测试时间
0.01M NaOH、0.01M HCl	一周
5mM DTT、10mM EDTA、1M NaOH、 5mM TCEP、20mM 巯基乙醇、6M 盐酸胍	24 小时
20mM DTT、100mM EDTA、500mM 咪唑	2 小时
30%异丙醇	20 分钟

2. 纯化步骤

2.1 准备缓冲液

在使用 High Affinity Ni-TED Resin FF 进行蛋白纯化时，缓冲液的选择原则是低咪唑浓度上样，高咪唑浓度洗脱，或者高 pH 上样，低 pH 洗脱。实验人员可以使用以下推荐的缓冲液，也可以根据自己的实验习惯配制缓冲液。为了减少系统反压，缓冲液在使用前最好用 0.22 um 或 0.45 um 滤膜过滤除菌。

结合缓冲液	20 mM NaH ₂ PO ₄ , 0.5 M NaCl, pH7.4
洗杂缓冲液	20 mM NaH ₂ PO ₄ , 0.5 M NaCl, 0~30 mM 咪唑, pH7.4
洗脱缓冲液	20 mM NaH ₂ PO ₄ , 0.5 M NaCl, 250~500 mM 咪唑, pH7.4

注意：

- 1) 为了增加目的蛋白纯度，可以在洗杂缓冲液中加入低浓度的咪唑（0~30 mM），但不建议在结合缓冲液中加入咪唑，以免降低填料的结合能力；
- 2) 为了减少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；
- 3) 为了增加洗脱能力，可以适当增加咪唑浓度，也可以选择降低洗脱液 pH（2.5-5.0），或者将二者结合使用；如果蛋白质对低 pH 值敏感，建议用含有 1 M Tris-HCl, pH 9.0（60-200 μl/ml 份）的管子收集 pH 洗脱的组分，以维持 pH 的中性（不要使用 NaOH）；
- 4) 若样品为包涵体表达，需要在所有缓冲液中加入 8M 尿素或者 6M 盐酸胍，以助标记蛋白质的溶解。

2.2 准备样品

- 1) 样品应充分溶解。为避免柱堵塞，建议离心并经 0.45 μm 滤器过滤，以去除细胞碎片或其他颗粒物。如不使用推荐的缓冲液（20 mM 磷酸盐，0.5 M NaCl, pH7.4）溶解样品，其他缓冲液应调 NaCl 浓度至 0.5M, pH 至 7-8，可以通过用结合缓冲液稀释或缓冲液置换来实现。不要使用强碱或酸调节 pH（有沉淀风险）。

- 2) 如果样品中含有可耐受范围内的试剂，可以直接上样。

2.3 纯化样品

2.3.1 柱层析纯化

- 1) 平衡：根据实验需求，将适量的 High Affinity Ni-TED Resin FF 装入层析柱中，随后使用 5-10 倍柱体积的结合缓冲液清洗填料，使其处于与目的蛋白相同的缓冲体系。
- 2) 上样：将处理好的样品添加到 High Affinity Ni-TED Resin FF 中，在此过程中需保证样品与填料充分接触，以提高目的蛋白的回收率。
- 3) 洗杂：使用 10-15 倍柱体积的洗杂缓冲液对填料进行清洗，直至紫外吸收值达到一个稳定的基线，去除非特异性吸附的杂蛋白。
- 4) 洗脱：使用洗脱缓冲液洗脱，洗脱成分可以分段收集进行分析，得到目的蛋白组分。
- 5) 待洗脱结束后，依次使用 5 倍柱体积的结合缓冲液和 5 倍柱体积的去离子水清洗填料，然后用 5 倍柱体积的 20%乙醇平衡，最后将填料保存于等体积的 20%乙醇中，防止填料染菌。

2.3.2 批量纯化

- 1) 平衡：根据实验需求，将适量的 High Affinity Ni-TED Resin FF 装入离心管中，500xg 离心 3-5 min，去除上清液（应小心操作，避免取出介质），然后加入 5 倍柱体积的结合缓冲液混合均匀，再次 500xg 离心 3-5 min，去除上清，重复 2-3 次，使其处于与目的蛋白相同的缓冲体系。
- 2) 上样：加入样品，盖上离心管盖子，然后室温旋转孵育 0.5-2h（4 度条件下，可以适当延长孵育时间），在此过程中需保证样品与填料充分混合，以提高目的蛋白的回收率。
- 3) 洗杂：孵育结束后，500xg 离心 3-5 min，收集上清，用于 SDS-PAGE 分析。加入 5-10 倍柱体积的洗杂缓冲液混合均匀，500xg 离心 3-5min，去除上清，重复清洗 3-5 次，去除非特异性吸附的杂蛋白。
- 4) 洗脱：加入 3-5 倍柱体积的洗脱缓冲液，室温旋转孵育 10-15min 进行洗脱，500xg 离心 3-5 min，收集上清，重复洗脱 3 次，得到目的蛋白组分。
- 5) 待洗脱结束后，依次使用 5 倍柱体积的结合缓冲液和 5 倍柱体积的去离子水按照离心方式清洗填料，然后用 5 倍柱体积的 20%乙醇平衡，最后将填料保存于等体积的 20%乙醇中，防止填料染菌。

2.4 SDS-PAGE 检测

对纯化过程中得到的流出组分、洗杂组分和洗脱组分以及原始样品进行 SDS-PAGE 分析，以检测纯化效果。

3. 在位清洗

正常情况下，High Affinity Ni-TED Resin FF 是无需重新挂镍再生的。在使用过程中，如果发现反压过高或者填料表面出现明显的污染物时，需要对其进行原位清洗操作（Cleaning-in Place, CIP）。可以按照以下操作去除填料上残留的污染物。

需要去除的污染物	操作
离子作用结合的蛋白	1、使用 5 倍柱体积的 1.5 M NaCl 溶液清洗 10~15 min; 2、使用 10 倍柱体积的去离子水或平衡液清洗
沉淀蛋白、疏水结合蛋白和脂蛋白	1、使用 1 M 的 NaOH 溶液清洗 1~2 h（如果是去除内毒素，则需要更长的时间）； 2、使用 10 倍柱体积的去离子水或平衡液清洗
疏水结合的蛋白，脂蛋白和脂类	1、使用30%异丙醇（5~10 倍柱体积），清洗 15~20 min； 2、使用10倍柱体积的去离子水或平衡液清洗或者使用含有 0.1~0.5%非离子去污剂的0.1M醋酸溶液，清洗 1~2h； 3、使用5倍柱体积的70%乙醇，以去除多余的去污剂； 4、使用 10 倍柱体积的去离子水或平衡液清洗

4. 问题及解决方案

问题描述	原因分析	解决方案
柱子反压过高	填料被堵塞	1) 上样前使用 0.22 um 或 0.45 um 滤膜过滤样品，或者离心处理； 2) 柱子使用次数过多，进行原位清洗处理
	流速过快	适当减少流速
洗脱组分中没有目的蛋白	样品中没有 His 标签	采用 Western Blotting 等确定样品中是否含有目的蛋白
	组氨酸标签未完全暴露	考虑在其它位置插入组氨酸标签
	目的蛋白降解	在进行菌体破碎时加入一些蛋白酶抑制剂
	目的蛋白表达量太少	优化蛋白表达条件
	目的蛋白结合较弱，在洗杂时被洗下来	适当降低洗杂液的咪唑浓度，或升高洗杂液的 pH

	目的蛋白结合太强，没有洗脱下来	适当增加洗脱液的咪唑浓度，或降低洗脱液的pH
洗脱组分中目的蛋白纯度较低	洗杂不充分	增加洗杂体积
	原始样品中存在其它组氨酸标签蛋白	调节洗杂液的咪唑浓度或pH值，将杂蛋白清洗完全；使用其它纯化技术（如离子交换层析、疏水层析等）对洗脱组分进行下一步纯化
上样时有蛋白沉淀	蛋白不稳定，发生聚集	在样品及所有缓冲液中添加蛋白稳定剂，如0.1%的Triton X-100 或者Tween-20

For research and manufacturing use. Direct human use, including taking orally and injection are forbidden.

生产商：南京金斯瑞生物科技有限公司 江苏省南京市江宁区科学园雍熙路28号

Manufacturer: Nanjing GenScript Biotech Co., Ltd. No. 28 Yongxi Road, Jiangning District, Nanjing, Jiangsu, China