

产品 HisBond NTA-μSphere

产品描述

HisBond NTA-μSphere是一种以NTA为填料的预装柱, 整合有牢固的Ni离子, 主要应用于组氨酸标记蛋白的捕获和纯化。HisBond NTA-μSphere洗杂蛋白推荐咪唑浓度在0—30mM。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, 0.1 M NaOH, 8M尿素、6M盐酸胍	1周
1M NaOH, 70%乙酸	12小时

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 NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, pH 8.0

Wash Buffer: 20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 0-30 mM imidazole, pH 8.0

Elution Buffer: 20 mM NaH₂PO₄, 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 NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 8 M Urea, pH 8.0

Wash Buffer: 20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 8 M Urea, 0-30 mM imidazole, pH 8.0

Elution Buffer: 20 mM NaH₂PO₄, 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℃, 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℃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℃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(含有多种蛋白)	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。