

# His 标签蛋白纯化亲和层析介质 使用说明书

Uni<sup>®</sup>IDA-80Ni

Uni<sup>®</sup>NTA-80Ni

Uni<sup>®</sup>IDA-80L

Uni<sup>®</sup>NTA-80L

使用之前请认真阅读产品使用手册

**全国咨询热线：400-828-1622**

苏州纳微科技有限公司

中文网站：[www.nanomicrotech.com](http://www.nanomicrotech.com)

English Website: [www.nanomicro-technology.com/](http://www.nanomicro-technology.com/)

E-mail：[info@nanomicrotech.com](mailto:info@nanomicrotech.com)

公司总部地址：苏州工业园区百川街2号 苏州 中国

## 通用缩略术语：

**280 nm**：在指定波长的紫外吸收

**M**：物质的量的浓度单位，mol/l 的简写

**mM**：物质的量的浓度单位，mmol/l 的简写

**BV**：柱体积，bed volume 的简写

**Mr**：相对分子量

**MPa**：兆帕斯卡

**Bar**：压强单位，工程上“公斤力”的单位

**psi**：压强单位，磅每平方英寸

**压强单位之间换算**：1 MPa = 10 bar  $\approx$  145 psi

# 索引目录

1. 标签蛋白纯化亲和层析产品简介 .....	4
2. 层析纯化操作步骤 .....	4
2.1 层析柱装填 .....	4
2.2 柱效评价 .....	5
2.3 清洗 .....	5
2.4 平衡 .....	5
2.5 金属螯合 .....	5
2.6 上样 .....	6
2.7 洗脱 .....	6
2.8 再生 .....	6
2.9 在位清洗 .....	6
3. 储存 .....	7
4. 故障排除 .....	7
5. 订购信息 .....	8

# 1. 标签蛋白纯化亲和层析产品简介

重组蛋白的富集和纯化一般采用已知大小的标签, 通过重组表达之后, 利用标签和填料的特异性相互作用, 达到分离纯化效果。固定金属离子或金属螯合亲和层析 (MAC) 利用蛋白质表面的某些氨基酸 (如组氨酸、色氨酸、半胱氨酸等) 和固定在层析介质上的过渡金属离子 ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  等) 以配位键结合, 从而实现对不同标签蛋白质的分离。影响蛋白质与金属离子螯合作用大小的因素, 主要是蛋白质表面可结合的氨基酸 (种类、数目和分布)、金属离子的种类和密度、层析条件 (pH、盐的种类和浓度、添加剂等)。固定金属离子亲和层析介质具有吸附容量大、选择性好、分辨率高、易于再生、成本较低等优点, 广泛用于生物制药和生物制品的下游蛋白质、核酸及多肽的分离纯化, 尤其是组氨酸标记 (His-Tag) 蛋白质的分离纯化。

纳微科技提供的固定金属离子亲和层析介质以多孔聚丙烯酸酯为基质, 具有良好的稳定性、生物相容性和溶剂相容性, 既有利于保持生物药或制品的生物活性和提高产品的收率, 还有利于扩大层析操作条件的选择范围。

UniIDA-80L 和 UniNTA-80L 为螯合固定金属离子的介质, 使用者可以根据需要螯合不同的过渡金属离子 ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  等); UniIDA-80Ni 和 UniNTA-80Ni 为预先螯合了  $\text{Ni}^{2+}$  的介质, 使用者不需要螯合固定金属离子即可直接使用。

## 2. 层析纯化操作步骤

### 2.1 层析柱装填

匀浆液的浓度是指层析介质沉降至恒定体积时的体积与匀浆液的总体积的比值。为了获取最佳的固定金属离子层析介质的装柱效果, 我们推荐 2 M NaCl 匀浆, 匀浆液浓度为 30~50%。具体装柱方法如下:

1) 首先计算所装色谱柱的柱体积  $V_c$ ,  $V_c = A_c \times L$ ,  $A_c = \pi \times r^2$ 。

\*  $V_c$ : 色谱柱柱体积;  $A_c$ : 色谱柱横截面积;  $L$ : 色谱柱高度;  $r$ : 色谱柱半径。

2) 在原容器中轻轻搅动金属螯合亲和层析介质, 使其完全分散在液体中形成匀浆液。量取所需原液的质量或体积\*。

\* 一般情况下, 金属螯合亲和层析介质在压力作用下都会被压紧导致体积收缩, 为了获得紧密的柱床, 推荐填料的体积过量一些, 一般为柱体积的 1.2 倍左右。

3) 将所需金属螯合亲和层析介质转移至适当容器, 自然沉降后, 倾斜倒去上清液。

4) 装柱前, 过滤原液\*, 并用 3 倍柱体积去离子水清洗。

\* 纳微科技的金属螯合亲和层析介质保存在 20% 乙醇溶液。

5) 用 2 M NaCl 溶液匀浆, 推荐匀浆液浓度 30~50% (体积比)。

6) 在建议的压力范围内使用泵装柱, 推荐装填流速为至少两倍常规操作流速。

## 2.2 柱效评价

装好的色谱柱应使用 3~5 BV 去离子水清洗。色谱柱装填好后，用去离子水以 50~200 cm/h 流速平衡并进行柱效测试。具体测试参数详见下表：

表 2.1 金属螯合亲和层析色谱柱的柱效测试

样品：	5% (v/v)丙酮的水溶液或 2 M NaCl
上样量：	1~5%柱体积
洗脱液：	去离子水
线性流速：	50~200 cm/h
检测：	5%丙酮上样：UV @ 280 nm 2 M NaCl 上样：电导检测仪 11

## 2.3 清洗

装好的色谱柱应使用至少使用 5 BV 的去离子水清洗。

## 2.4 平衡

在进行柱层析前，使用 3 到 5 倍柱体积的流动相。  
一般为缓冲液，如：20 mM PBS + 0.5 M NaCl, pH 7.0 平衡。

## 2.5 金属螯合

本介质可以根据需要螯合不同的金属离子，如  $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 等。一般情况下， $\text{Cu}^{2+}$ 与蛋白质结合最强， $\text{Ni}^{2+}$ 与蛋白质结合适中， $\text{Zn}^{2+}$ 与蛋白质结合最弱，可根据实际需要选择。使用者也可选择螯合了相应金属离子的介质（如 UniIDA-80Ni 和 UniNTA-80Ni，首次使用无需螯合金属离子步骤），也可自行螯合。

具体的螯合步骤如下：

- (1)层析柱（未螯合或再生后）用 5 BV 的去离子水清洗；
- (2)选择合适的金属离子（ $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 等），溶解在中性或弱酸性溶液中（其中  $\text{Fe}^{3+}$ 必须在较低 pH（约为 3）下螯合，以防止  $\text{Fe}^{3+}$ 产生沉淀），金属离子浓度为 0.1 mol/L，过滤后备用；
- (3) 将 5 BV 的金属离子溶液用泵上层析柱，螯合金属离子；
- (4)用 5 BV 以上的去离子清洗层析柱，去除未被螯合的金属离子。

2-4-5 用 5 BV 以上的平衡缓冲液平衡层析柱，实际操作中，一般选用中性（pH 7~8）的高盐（0.2~1.0 M NaCl 或其它中性盐）缓冲液，如：20 mM PB + 0.5 M NaCl, pH 7.0。对

于结合力较强的蛋白质，平衡缓冲液中可加入低浓度（5~50 mM）的咪唑（具体浓度需要根据样品进行优化）。

此外，也可以直接把清洗干净或再生后的介质和金属离子溶液混合后在摇床上振荡 2 小时，螯合金属离子，然后再装柱。

\* UniIDA-80Ni 和 UniNTA-80Ni 首次使用不需要螯合

## 2.6 上样条件

将经过离心或膜过滤后的上样液溶解在缓冲液中（20 mMPBS 缓冲液 pH 7.0 + 0.5 M NaCl + 5~50 mM 咪唑）。为了减少杂蛋白在层析柱上的吸附，其中咪唑的浓度根据不同的蛋白决定，一般的蛋白可选择 5-50 mM 浓度范围（与平衡缓冲液浓度保持一致）。

## 2.7 洗脱

上样完毕后继续用平衡缓冲液淋洗至基线稳定，样品可以根据实际情况采取提高缓冲液中咪唑的浓度或通过改变洗脱缓冲液 PH 值（大多数蛋白质在 pH 4~6 的范围内可被洗下来）洗脱吸附于层析介质上的样品（需在洗脱缓冲液中加入 0.2~1.0 M 的 NaCl 以抑制离子交换作用）。如使用提高咪唑浓度方法，建议的洗脱条件为：20 mM PBS 缓冲液 pH 7.0 + 0.5 M NaCl + 0.5 M 咪唑（洗脱时咪唑的浓度根据不同蛋白决定）。对于包涵体蛋白，可在平衡、上样和洗脱的缓冲液中加入 8 M 尿素或 6 M 盐酸胍，洗脱后再对变性蛋白进行复性。

## 2.8 再生

介质使用数次后（约 3~20 次，具体与原料来源、样品体积等有关），或者更换螯合金属离子类型前，需要进行再生处理。

具体操作步骤如下：

- (1) 使用 5 BV 的去离子水清洗层析柱；
- (2) 使用 5 BV 的 20 mM PB + 0.5 M NaCl + 50 mM EDTA，pH 7.0 清洗层析柱，以除去金属离子；
- (3) 使用 5 BV 的 20 mM PB + 0.5 M NaCl，pH 7.0 溶液清洗层析柱；
- (4) 使用 5 BV 的去离子水清洗层析柱；
- (5) 按照 II-5 操作步骤重新螯合金属离子。

## 2.9 在位清洗

为了保持层析柱的性能，若有蛋白质或其他杂质在再生过程中未能有效去除，可执行在位清洗步骤，在位清洗时，也可采用反向冲洗的方法，具体操作步骤如下：

- (1) 使用 5 BV 的 20 mM PB + 0.5 M NaCl + 50 mM EDTA，pH 7.0 清洗层析柱，以除去金属离子；
- (2) 对于以离子键结合的蛋白，可用 3 BV 以上的 2 M NaCl 清洗，并用 3 BV 以上的去离子水清洗；
- (3) 对沉淀蛋白、以疏水性结合的蛋白或脂蛋白，可用 0.2~0.5 M NaOH 清洗（与层析介质

接触时间 1~2 小时), 并用 5 BV 以上平衡液和 3 BV 以上的去离子水清洗;

(4) 对疏水性结合的蛋白、脂蛋白和脂类物质, 可用 5 BV 以上的 50%乙醇或 30%异丙醇清洗 (与层析介质接触时间 0.5~1 小时), 并用 5 BV 以上的去离子水清洗。也可用含非离子表面活性剂的碱性或酸性溶液清洗, 如用 0.1~0.5%的 Triton X-100 + 0.1 M 乙酸清洗 1~2 小时, 并用 5 BV 以上的 50%乙醇冲洗去除去污剂, 然后用 5 BV 以上的纯水冲洗; 按照 II-5 操作步骤重新螯合金属离子。

### 3. 储存

暂时不使用的层析介质需保存在 4~35°C 的 20%乙醇中, 并盖紧瓶盖, 已经装好层析柱应保存在含 20%乙醇的缓冲液(pH 7.0)中。

### 4. 故障排除

如果您在使用金属螯合亲和层析介质中遇到任何问题, 请参考下表进行解决或联系苏州纳微科技有限公司。

表 4.1 金属螯合亲和层析柱常见问题及故障排除

情况	原因	措施
柱压升高	流速过高	减小流速
	泵和收集器之间的阀门未打开	打开出口
	仪器的滤膜堵塞	除去并清洗, 可能的话替换。在使用前过滤样品和洗脱液
	柱前堵塞	使用 20BV 流动相反冲色谱柱
	样品在柱子上发生沉淀	遵循清洗步骤, 调节洗脱液来维持样品溶解度
	样品较脏, 或一些吸附作用较强的物质留在填料上	执行在位清洗操作 (参考“再生条件”)
	柱床被压缩	重新装填柱子
样品吸附不够充分	平衡液中咪唑浓度过高	调整平衡液中咪唑浓度
	样品溶液的 pH 不合适	调节 pH 增加结合
样品在洗脱过程中不被洗脱	洗脱液的咪唑浓度过低	增加洗脱液中咪唑的浓度
	洗脱液的 pH 不合适	调整洗脱液的 pH
	洗脱液中离子强度过低产生离子交换作用	提高洗脱液的盐浓度抑制离子交换作用
	洗脱液的咪唑浓度过低	增加洗脱液中咪唑的浓度
分辨率降低	不合适的洗脱条件, 如梯度过陡或流速过高	改变洗脱条件, 采用较缓的梯度洗脱或等度洗脱, 降低流速
	柱子未装填好	重新装柱
	在柱子顶端或柱后有大部分的混合空间	加高填料的上表面或减少柱子后体积
	柱子过载	清洗并重新平衡色谱柱, 降低上样量
进样若干次后对样品的吸附能力降低	样品中的杂质结合在填料上, 干扰了正常的结合	执行在位清洗操作 (参考“再生条件”)
基线漂移	色谱柱未平衡好	增加平衡时间

情况	原因	措施
	洗脱液 A, B 在同一紫外波长下吸收系数不同	使用不同的波长或走没有样品的空白梯度
	洗脱液不纯	使用高纯度的 HPLC 级试剂
出现不明杂峰	前一个样品的不完全洗脱	洗脱色谱柱
	洗脱液不纯	运行没有样品的空白梯度对照, 或使用高纯度的 HPLC 级别试剂
	痕量杂质结合在色谱柱上, 在平衡和上样过程中被浓缩, 洗脱时出峰	清洗色谱柱 (参考“再生条件”) 或采取适当方法将结合在色谱柱上的杂质洗脱下来
	不稳定的非重现性的鬼峰	与仪器的不稳定有关

## 5. 订购信息

产品名称	官能基团	粒径	孔径	最大耐压	建议 线性流速	pH 稳定范围 <sup>1</sup>	每毫升介质结合量
		μm	Å	MPa	cm/h		
<b>标签蛋白纯化亲和层析介质</b>							
<b>His 标签蛋白的纯化, 高载量</b>							
Uni <sup>®</sup> IDA-80Ni	Ni <sup>2+</sup>	80	1000	0.5	150-750	2-12	> 20 mg His 蛋白
<b>His 标签蛋白的纯化, 低配基脱落</b>							
Uni <sup>®</sup> NTA-80Ni	Ni <sup>2+</sup>	80	1000	0.5	150-750	2-12	> 10 mg His 蛋白
<b>用于螯合或固定金属离子, 高载量</b>							
Uni <sup>®</sup> IDA-80L	-N(CH <sub>2</sub> COOH) <sub>2</sub>	80	1000	0.5	150-750	2-12	30 μmol Ni <sup>2+</sup> /ml gel
<b>用于螯合或固定金属离子, 低配基脱落</b>							
Uni <sup>®</sup> NTA-80L	-N(CH <sub>2</sub> COOH) <sub>3</sub>	80	1000	0.5	150-750	2-12	25 μmol Ni <sup>2+</sup> /ml gel

1. pH 稳定范围指使用、再生、在位清洗的 pH 区间

注：其他规格的产品可特殊定制，层析柱或分析柱产品请咨询纳微科技业务代表

**全国咨询热线：400-828-1622**

苏州纳微科技有限公司

中文网站：www.nanomicrotech.com

English Website: www.nanomicro-technology.com/

E-mail：info@nanomicrotech.com

公司总部地址：苏州工业园区百川街 2 号 苏州 中国