

Ni-NTA 亲和层析介质
Cat.No.L00250
版本号: 05052017
目录

I. 产品描述	1
II. 纯化步骤	2
III. 故障排除	4
IV. 订购信息	4

I. 产品描述

金斯瑞 Ni-NTA 亲和层析介质 (产品编号 L00250) 是把 NTA (氮川三乙酸) 共价偶联到 4% 的琼脂糖介质上, 再通过 NTA 的 4 个结合位点螯合 Ni^{2+} 制备而成的亲和层析介质。Ni-NTA 亲和层析介质的 Ni^{2+} 脱落率非常低, 它能耐受蛋白纯化过程中使用的很多添加剂, 并且有着较高的蛋白结合能力和稳定性, 因此 Ni-NTA 亲和层析介质非常适用于多组氨酸重组蛋白的纯化。我们提供 10 ml, 25ml, 500 ml 三种规格的包装。

表 1 : 产品特征

柱体积	10 ml、25 ml 和 500 ml (20 ml、50 ml 和 1000 ml 的 50 % 悬浆液)
吸附量	每毫升填料吸附量 > 20 mg 6xHis-tagged 蛋白 (27 kDa)
基质	4% 琼脂糖
平均粒径	90 μm (45-165 μm)
保护液	1×PBS (含 20% 乙醇)
存储条件	2-8°C
保质期	2-8°C 储存 18 个月

表 2 : Ni-NTA 亲和层析介质可耐受试剂

变性剂	表面活性剂	还原剂	盐	其他
6 M 盐酸胍	2% Triton X-100	20 mM β -ME	4 M MgCl_2	50% 甘油
8 M 尿素	2% Tween 20	1 mM DTT	5 mM CaCl_2	20% 乙醇
	1% CHAPS		2 M NaCl	1 mM EDTA

II. 纯化步骤

常规条件下纯化多组氨酸标签蛋白

1 试剂准备

所用缓冲液需采用高纯水配制，使用前建议用 0.45 μm 滤膜过滤。

Lysis 平衡缓冲液 (LE Buffer) : 50 mM Na_2HPO_4 , 0.3 M NaCl, pH=8.0

洗涤缓冲液 : 50 mM Na_2HPO_4 , 0.3 M NaCl, 10 mM imidazole pH =8.0

洗脱缓冲液 : 50 mM Na_2HPO_4 , 0.3 M NaCl, 250 mM imidazole pH =8.0

2 样品准备

大肠杆菌或酵母细胞质中表达的重组蛋白

(1) 4°C离心 (如 : 5000 rpm 离心 5 分钟) 收集 50 ml 培养基中的细胞。

(2) 加入 8 ml LE Buffer 重新悬浮细胞，如有需要可加入适量的 PMSF 或者其他蛋白抑制剂。

注意：加入的蛋白抑制剂应确定它不会和 Ni-NTA 亲和层析介质反应。

(3) 超声破碎细胞，在冰上进行操作，破碎 1 秒，冷却 3 秒，总时间为 30-45 分钟；

可选：如果样品太粘稠，可加入 RNase A (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 和 DNase (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ，放置于冰上 10-15 分钟。

(4) 4 °C ， 1,2000 rpm 离心裂解液 15 分钟，以沉淀细胞碎片，收集上清液待过 Ni-NTA 亲和层析介质。

培养基中酵母，昆虫细胞，哺乳动物细胞分泌表达的蛋白

(1) 如果培养基上清中不含有 EDTA、组氨酸或者其他还原性试剂等可能影响 Ni-NTA 亲和层析介质性能的话，该培养基可以直接上柱纯化，否则必须进行下面步骤。

(2) 上柱前将样品透析于 1×PBS 中。

(3) 对于较大体积的培养基上清，可以通过硫酸铵沉淀浓缩蛋白，再用 1×PBS 溶解并透析蛋白，准备上样。

3 层析柱填充

1) 轻轻颠倒翻转瓶子几次，使介质混合均匀。

2) 吸取一定量的介质加入到柱子中，让介质自由沉降，并放干储存液。

3) 加入 4 倍柱体积的平衡缓冲液平衡层析介质或者待流出液的紫外吸光度 A280 值达到最低且稳定。

4 过柱纯化

1) 将含多聚组氨酸标签蛋白的澄清样品上样至柱中，流速控制为 0.5-1 ml/min ，收集流出液以待后续分析；

2) 以流速为 1 ml/min 的洗涤缓冲液洗涤柱子以去除杂蛋白，一般用量为 8 倍柱体积，或者直到流出液的 A280 值达到最低且稳定；

3) 用 5-10 倍柱体积的洗脱缓冲液以 0.5-1 ml/min 的流速洗脱, 收集洗脱液, 或根据流出液 A280 值判断, 当数值陡然上升时开始接收洗脱液, 直到 A280 数值降至最低且稳定停止收集。根据目的蛋白的性质和用途选择透析到 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 或者 1 × PBS, pH 7.4 中。

变性条件下纯化大肠杆菌表达的多组氨酸标签蛋白

这个方案主要用于纯化大肠杆菌中以包涵体形式表达的重组蛋白。

1. 试剂准备

所用缓冲液需采用高纯水配制, 使用前建议用 0.45 μm 滤膜过滤。

Lysis 平衡缓冲液 (LE Buffer): 100 mM Na₂HPO₄, 10 mM Tris-Cl, 8 M Urea, pH 8.0

洗涤缓冲液: 100 mM Na₂HPO₄, 10 mM Tris-Cl, 10 mM imidazole, 8 M Urea, pH 8.0

洗脱缓冲液: 100 mM Na₂HPO₄, 10 mM Tris-Cl, 250 mM imidazole, 8 M Urea, pH 8.0

2. 包涵体溶解

1) 将细胞用 1×PBS 重新悬浮, 利用 2.1.2 中的方法破碎细胞。

2) 离心 (12000 rpm, 4°C, 10 分钟) 收集包涵体。如有需要, 可用 1×PBS 洗涤包涵体几次。

3) 使用 LE Buffer 溶解包涵体 (约 7.5 ml/mg 包涵体), 室温孵育 30-60 分钟。利用搅拌或者超声可以使包涵体更加有效地溶解。

4) 12000 rpm 离心 30 分钟, 去除沉淀。

3. 过柱纯化

1) 把样品加入事先平衡好的 Ni-NTA 树脂中, 让样品缓慢地流出, 流速大约为 0.5-1 ml/min。收集流出液, 待后续可使用 SDS-PAGE 检测纯化效率。如有必要, 可以重复或循环上样。

2) 使用 LE Buffer 洗涤填料, 直到紫外检测仪 A280 值稳定为止。

3) 用 2 倍柱体积的洗涤缓冲液洗涤填料。

4) 使用尽量少的洗脱缓冲液洗脱。

注意: 这个实验方案是用于变性条件下纯化包涵体表达的重组蛋白, 因此洗脱液中的蛋白需要进行复性和折叠来恢复重组蛋白的活性。

4. 填料再生

为了能够充分再生, 按照下列步骤依次洗涤介质:

1) 2 倍柱体积的 6 M GuHCl, 0.2 M 乙酸进行洗涤;

2) 5 倍柱体积的去离子水进行洗涤;

3) 3 倍柱体积的 2% 的 SDS 进行洗涤;

4) 5 倍柱体积的去离子水进行洗涤;

5) 5 倍柱体积的 100% 乙醇进行洗涤;

- 6) 5 倍柱体积的去离子水进行洗涤；
- 7) 5 倍柱体积的 100 mM EDTA (pH 8.0) 进行洗涤；
- 8) 5 倍柱体积的去离子水进行洗涤；
- 9) 5 倍柱体积的 100 mM NiSO₄ 进行洗涤；
- 10) 10 倍柱体积的去离子水进行洗涤；
- 11) 为了长时间的保存，介质应当 2-8 °C 保存在 1× PBS (含 20 % 乙醇) 中。

III. 故障排除

问题	可能原因	解决方案
洗脱液中没有重组蛋白	蛋白折叠导致标签不能暴露	尝试使用变性条件
	重组蛋白表达量较低	优化表达条件
	重组蛋白样品上样量较低	加大上样量
	融合蛋白降解	把整个过程放置在 4°C 进行，在细胞破碎液和洗涤缓冲液中加入适量的 PMSF 等蛋白酶抑制剂
	目的蛋白被洗涤缓冲液液洗下来	洗杂时，把洗涤缓冲液改换成 LE Buffer
	重组蛋白和纯化介质之间的亲和力过高	降低洗脱缓冲液的 pH 或者提高咪唑浓度 使用 EDTA 或者 EGTA (10-100 mM) 来剥离纯化介质中的 Ni ²⁺ ，从而洗脱蛋白
回收的重组蛋白不纯	洗杂不完全	使用更多柱体积的洗涤缓冲液
	样品中和含有携带 His 的杂蛋白	洗脱前使用，高浓度咪唑低 pH (4-6) 的洗涤缓冲液洗涤
		尝试咪唑浓度梯度洗脱或者 pH 梯度洗脱
柱子变白	Ni ²⁺ 从纯化介质中剥离	按说明书中的步骤再生柱子

IV. 相关产品

Ni-NTA 亲和层析介质 产品编号：L00250
 Ni-IDA 亲和层析介质 产品编号：L00223I

For research use only