

Version : 01

Update : 06/02/2021

Ni-IDA 亲和层析介质**Cat.No. L00223I****目录**

I. 产品描述	1
II. 纯化步骤	2
III. 常见问题	4
IV. 订购信息	4

I. 产品描述

金斯瑞 Ni-IDA 亲和层析介质 (产品编号 L00223I) 是把 IDA (亚氨基二乙酸) 共价偶联到 4 %交联的琼脂糖介质上, 再通过 IDA 的 3 个结合位点螯合 Ni^{2+} 制备而成, 并提供了三个离子键结合部位高亲和地纯化含有多聚组氨酸标签的重组蛋白。金斯瑞 Ni-IDA 亲和层析介质的 Ni^{2+} 脱落程度很低, 并具有高吸附量及高稳定性, 在多聚组氨酸标签的重组蛋白的纯化实验中有非常好的表现力, 具体特性见表 1。

表 1. Ni-IDA 亲和层析介质的特性

球形基质	4 %交联琼脂糖
平均粒径	90 μm (45-165 μm)
动态吸附量	20 mg 6 $\times$ His 标签蛋白 (27 kD) /ml 介质
储存溶剂	1 $\times$ PBS (含 20%乙醇)
储存温度	2-8 $^{\circ}\text{C}$; DO NOT FREEZE

II. 纯化步骤

天然条件下纯化多聚组氨酸标签蛋白

1. 缓冲液配制

用于配制缓冲液的水和化学试剂必须是高纯度的，并建议使用前用 0.45 μm 滤膜过滤一遍。

平衡缓冲液：50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 用 NaOH 调 pH 为 8.0

洗涤缓冲液：50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM 咪唑, 用 NaOH 调 pH 为 8.0

洗脱缓冲液：50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 250 mM 咪唑, 用 NaOH 调 pH 为 8.0

2. 样品制备

A 大肠杆菌系统或酵母胞质系统表达蛋白

- (1) 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下用 50 ml 离心管离心收集细胞；
- (2) 用 8 ml 平衡缓冲液重悬细胞，可以加入适量的 PMSF 或其他蛋白酶抑制剂；
注意：加入的抑制剂不能对 Ni-IDA 亲和层析介质的性能有影响，破碎液中不能含有 EDTA、EGTA 等螯合剂，DTT、巯基乙醇等还原剂，尿素、盐酸胍等变性剂。
- (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：如果裂解物太粘稠，可以加入 RNase A（终浓度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）和 DNase I（终浓度 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）并在冰上孵育 10-15 分钟。
- (4) 4 $^{\circ}\text{C}$, 1,2000 rpm 离心裂解液以沉淀细胞碎片，收集上清液待过 Ni-IDA 亲和层析介质。

B 酵母、昆虫或者哺乳动物细胞表达系统分泌到培养基中的蛋白

- (1) 如果培养基上清中不含有 EDTA、组氨酸或者其它还原性试剂等可能影响 Ni-IDA 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 $\times$ 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，用 1 $\times$ PBS 透析溶解的蛋白，准备上样。

I 柱子制备

- (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直到流出液的紫外吸光度 A280 值达到最低且稳定。

II 柱子纯化

- (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/分钟，收集流出液以待后续分析；
- (2) 以流速为 1 ml/分钟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/分钟的流速洗脱，收集洗脱液。或者根据流出液 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。

5. 柱子再生

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 常见问题

问题	可能原因	解决办法
洗脱液中没有重组蛋白	重组蛋白表达量较低	优化表达条件
	重组蛋白样品的上样量较低	加大上样量
	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
	重组蛋白降解	4 °C 条件下进行纯化, 并使用蛋白酶抑制剂
回收的重组蛋白不纯	纯化介质洗涤不充分	使用更多柱体积的洗涤缓冲液
	样品中有其他富含 His 标签的蛋白	尝试咪唑浓度梯度洗脱
		使用另一类型的柱子进行第二次纯化
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 订购信息

产品信息	规格	产品编号
Ni-IDA 亲和层析介质	10 ml	L00223I
	25 ml	L00223I -25
	50 ml	L00223I -50
	100 ml	L00223I -100
	200 ml	L00223I -200

For research use only