

Version: 04

Update:09/30/2022

## Ni-NTA 亲和层析介质

### Cat.No.L00250

#### 目录

1. 产品描述	1
2. 纯化步骤	2
3. 故障排除	4
4. 订购信息	5

#### 1. 产品描述

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%琼脂糖介质上，再通过 NTA 的 4 个结合位点螯合 Ni<sup>2+</sup>制备而成的亲和层析介质。Ni-NTA 亲和层析介质的 Ni<sup>2+</sup>脱落率较低，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。

**表 1: 产品特征**

基质	4%琼脂糖
平均粒径	90 μm (45-165 μm)
吸附量	≥20 mg 6xHis-tagged 蛋白 (27 kDa)
储存溶液	含 20%乙醇的 1×PBS
储存温度	2-8°C; <b>DO NOT FREEZE</b>

**表 2: Ni-NTA 亲和层析介质可耐受试剂**

变性剂	洗涤剂	还原剂	盐类	其他
6 M Gu-HCl	2% Triton X-100	20 mM β-ME	4 M MgCl <sub>2</sub>	50% glycerol
8 M Urea	2% Tween 20	1 mM DTT	5 mM CaCl <sub>2</sub>	20% ethanol
	1% CHAPS		2 M NaCl	1 mM EDTA

## 2. 纯化步骤

### 2.1 常规条件下纯化多组氨酸标签蛋白

#### 2.1.1 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  $\mu\text{m}$  滤膜过滤。

Lysis 平衡缓冲液 (LE Buffer): 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.3 M NaCl, pH=8.0

洗涤缓冲液: 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.3 M NaCl, 10 mM imidazole pH =8.0

洗脱缓冲液: 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.3 M NaCl, 250 mM imidazole pH =8.0

#### 2.1.2 样品准备

##### 2.1.2.1 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;

**注意:** 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。

##### 2.1.2.2 培养基中酵母, 昆虫细胞, 哺乳动物细胞分泌表达的蛋白

(5) 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。

(6) 上柱前将样品透析于 1xPBS 中。

(7) 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 1xPBS 溶解并透析蛋白, 准备上样。

#### 2.1.3 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。

#### 2.1.4 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 x PBS, pH 7.4 中。

## 2.2 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。

### 2.2.1 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  $\mu\text{m}$  滤膜过滤。

Lysis 平衡缓冲液 (LE Buffer): 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM Tris·Cl, 8 M Urea, pH 8.0

洗涤缓冲液: 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM Tris·Cl, 10 mM imidazole, 8 M Urea, pH 8.0

洗脱缓冲液: 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM Tris·Cl, 250 mM imidazole, 8 M Urea, pH 8.0

### 2.2.2 包涵体溶解

- (1) 将细胞用 1xPBS 重新悬浮，利用 2.1.2.1 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 1xPBS 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。

### 2.2.3 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。

### 2.2.4 过柱纯化

- (1) 把样品加入平衡好的 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。

## 2.3 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 和 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 NiSO<sub>4</sub> 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。

### 3 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 <sup>2+</sup> ，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
		使用另一类型的柱子进行第二次纯化
柱子变白	Ni <sup>2+</sup> 从纯化介质中剥离	按说明书中的步骤再生柱子

#### 4 订购信息

Cat. No.	Product Name
L00433	Monofinity A Resin
L00464	Protein A Resin FF
L00209	Protein G Resin
L00664	Protein G Resin FF
L00239	Protein L Resin
L00465	Ni Resin FF
L00666	High Affinity Ni-Charged Resin FF
L00353	Streptavidin Resin
L00206	Glutathione Resin
L00207	GST Fusion Protein Purification Kit
L00403	High-Affinity Iodoacetyl Resin
L00295	Ni-charged MagBeads
L00776	AmMag™ Ni Magnetic beads

**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