



HisPur Ni NTA kit

目录

| | |
|-------------------|---|
| 1. 产品介绍..... | 1 |
| 2. 纯化流程..... | 2 |
| 3. 在位清洗..... | 3 |
| 4. 问题及解决方案..... | 3 |
| 5. 订购信息及相关产品..... | 4 |

1. 产品介绍

Ni NTA Beads 是以 4%琼脂糖凝胶为基质，通过化学方法偶联了四配位的氮川三乙酸 (NTA)，螯合镍离子 (Ni^{2+}) 后，可以形成非常稳定的八面体结构，镍离子处于八面体的中心，这样的结构保护了镍离子免受小分子的进攻 (产品结构见图 1 所示)，更加稳定，具体性能见表 1。**Ni NTA Beads** 可以耐受一定浓度的还原剂、变性剂或螯合剂等苛刻条件 (见表 2)，适用性更广，配体更稳定，选择性更高。

HisPur Ni NTA kit 提供 3ml **Ni NTA Beads** 重力预装柱和组氨酸标签蛋白纯化所需的缓冲液，方便客户使用，操作简单，纯化效率高。试剂盒详细组分见表 3。

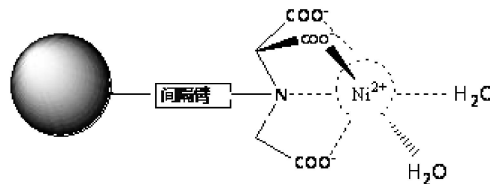


图 1. Ni NTA Beads 产品化学结构示意图

表 1. Ni NTA Beads 产品性能

| 项目 | 性能 |
|-------|-------------------------------------|
| 基质 | 4%琼脂糖凝胶 |
| 载量 | > 40 mg 6×His-tagged protein /ml 基质 |
| 粒径范围 | 45–165 μm |
| 最大压力 | 0.1 MPa, 1 bar |
| 储存缓冲液 | 含 20% 乙醇的 1×PBS |
| 储存温度 | 2-8℃ |

表 2. Ni NTA Beads 试剂耐受情况

| 试剂种类 | 浓度 |
|---------------|-----------------------------|
| 还原剂 | 5 mM DTE |
| | 1 mM DTT |
| | 20 mM β-mercaptoethanol |
| | 5 mM TCEP |
| 变性剂 | 10 mM Reduced Glutathione |
| | 8 M Urea |
| 去污剂 | 6 M Gua-HCl |
| | 2% Triton™ X-100 (nonionic) |
| | 2% Tween™ 20 (nonionic) |
| | 2% NP-40 (nonionic) |
| | 2% cholate (anionic) |
| 其他类 | 1% CHAPS (zwitterionic) |
| | 500 mM imidazole |
| | 20% ethanol |
| | 50% glycerol |
| | 100 mM Na_2SO_4 |
| | 1.5 M NaCl |
| 1 mM EDTA | |
| 60 mM Citrate | |

注：如果溶液中含有上述两种以上的试剂，介质的耐受性可能会进一步下降。



表 3. HisPur Ni NTA Kit 试剂盒组分

| 组分名称 | 货号 | 规格 | 数量 |
|---------------------------|-----------|--------|----|
| HisPur Ni NTA Column | SA004GC03 | 3 ml | 1 |
| His-tag Lysis/Wash Buffer | SLB013100 | 100 ml | 2 |
| His-tag Elution Buffer | SLB014100 | 100 ml | 1 |

2. 纯化流程

2.1 样品准备

2.1.1 细菌或酵母表达的蛋白

- 1) 挑取单菌落到培养基中，根据载体使用说明，加入相应浓度的诱导剂诱导相应的时间。
- 2) 表达结束后，将培养液转移到离心杯中，7000 rpm(7,500×g)，离心 15 min 收集菌体，然后按照菌体：Lysis/Wash Buffer=1：10 (W/V) 加入 Lysis/Wash Buffer，加入终浓度为 1 mM 的 PMSF。加入溶菌酶(工作浓度为 0.2-0.4 mg/ml，如果表达的宿主细胞内含 pLysS 或 pLysE，可以不加溶菌酶)，(同时也可加入其他蛋白酶抑制剂，但不能影响目的蛋白与树脂的结合)。
- 3) 将菌体沉淀悬浮起来，(如果菌液浓度高，也可考虑加入 10 μg/ml RNaseA 和 5 μg/ml DNase I)，混匀，放置于冰上，然后冰上超声破碎细胞，至菌液基本保持澄清。
- 4) 将澄清的破碎液转移至离心管中，10000 rpm(15,000×g)，4℃离心 20-30 min。取上清，置于冰上备用或-20℃保存。

2.1.2 酵母、昆虫和哺乳细胞分泌表达可溶性蛋白

- 1) 将细胞培养液转移至离心杯，5000 rpm(3,800×g)，离心 10 min，收集菌体得上清，如上清中不含 EDTA、组氨酸和还原剂等物质，即可直接加入柱子使用；如含有 EDTA、组氨酸和还原剂等物质，需用 Lysis/Wash Buffer 透析才能加入柱子。
- 2) 对于大量体积的上清，需加入硫酸铵沉淀浓缩后，蛋白还需用 Lysis/Wash Buffer 透析后才能加入柱子。

2.2 样品纯化

HisPur Ni NTA kit 提供 1 根填充 3 ml Ni NTA Beads 的重力预装柱 (HisPur Ni NTA Column)，2 瓶 100 ml 的 Lysis/Wash Buffer 和 1 瓶 100 ml 的 Elution Buffer。不要再进行填料填充和缓冲液配制。整个纯化流程大约需要 30 min (主要取决于样品体积和溶液的粘稠性)，操作快捷。使用时参考下面操作说明。

- 1) 将 HisPur Ni NTA Column 固定在铁架台上，依次去掉下端塞和上端塞，流干预装柱的保护液。
- 2) 向柱管中加入 5 ml Lysis/Wash Buffer，平衡柱子，流干后，再重复 2 次，共使用 15 ml Lysis/Wash Buffer。
- 3) 将处理好的样品加入柱管，收集流出液，用于 SDS-PAGE 分析蛋白质的结合情况，在出现问题时，更方便寻找解决问题的方案。
- 4) 加入柱管加入 5 ml Lysis/Wash Buffer，进行洗杂，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液目的与收集流出液的目的相同，Lysis/Wash Buffer 流干后，再重复 5 次，共使用 30 ml Lysis/Wash Buffer。
- 5) 使用 15-30 ml 的 Elution Buffer 进行洗脱目的蛋白，分段收集，每 5 ml 收集一管，分别检测，既可以保证所有结合的目的蛋白被洗脱，又可以得到高纯度和高浓度的蛋白。
- 6) 依次使用 5 ml Lysis/Wash Buffer 和 5 ml 去离子水交替平衡填料，重复 2 次，最后再用 5 ml 20%的乙醇平衡填料，重复 1 次，然后添加 5 ml 20%的乙醇到柱管中，置于 4℃保存，防止填料被细菌污染。

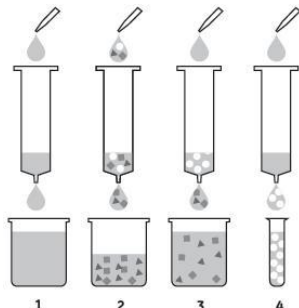


图 2. 使用 HisPur Ni NTA Column 纯化蛋白流程示意图

Step 1: 柱子平衡; Step 2: 上样; Step 3: 洗杂; Step 4: 洗脱

3. 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。



去除强疏水结合的蛋白，脂蛋白和脂类

通过使用 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。也可以选择使用含有去污剂的酸性或碱性溶液，清洗填料 2 倍柱体积。例如，含有 0.1-0.5% 非离子去污剂的 0.1 M 醋酸溶液，接触时间为 1-2 小时。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。

去除离子作用结合的蛋白

使用 1.5 M NaCl 溶液清洗 10-15 分钟。然后，再使用去离子水清洗 10 个柱体积。

4. 问题及解决方案

| 问题 | 原因分析 | 推荐解决方案 |
|----------------|----------------------|---|
| 柱子流速慢 | 填料被堵塞 | 样品中含有微小的固体颗粒，建议上柱前使用滤膜（0.22或0.45 μm）过滤，或者离心去除。 样品中含有高浓度的核酸，加长破碎时间直至粘度降低，或者添加 DNase I（终浓度 5 μg/ml），Mg ²⁺ （终浓度 1 mM），冰上孵育 10-15 分钟。 |
| | 样品太粘稠 | 有机溶剂或者蛋白稳定剂（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 | 蛋白可能是包涵体，没有在上清中 | 可以通过电泳检测分析上清中是否含有目的蛋白，包涵体蛋白需要按照包涵体蛋白的纯化方式。 |
| | 表达量太低 | 优化表达条件，使用包涵体纯化缓冲体系。 |
| | 目的蛋白结合比较弱，在洗杂步骤被洗下来了 | 提高 Lysis/wash Buffer 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 Elution Buffer 的 pH 值，或者增加 Elution Buffer 中咪唑浓度。 10-100 mM EDTA 溶液剥离镍离子，同时得到目的蛋白。 |
| 洗脱组分不纯（含有多种蛋白） | 洗杂不彻底 | 增加 Lysis/Wash Buffer 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。 |
| 填料呈现褐色 | 缓冲液中含有 DTT 等还原剂 | 参考表 2，适当降低还原剂 DTT 的浓度，或者改用巯基乙醇。 |
| 上样过程中蛋白发生沉淀 | 操作温度太低 | 室温下进行上样。 |
| | 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。 |

5. 订购信息及相关产品

| 名称 | 货号 | 规格 |
|-------------------|----------|---------------|
| Ni NTA Beads | SA004005 | 5 ml |
| | SA004025 | 25 ml |
| | SA004100 | 100 ml |
| | SA004500 | 500 ml |
| | SA00401L | 1 L |
| | SA00410L | 10 L |
| HisPur Ni NTA kit | SA004K03 | 3 次 |
| Ni NTA Beads 6FF | SA005005 | 5 ml |
| | SA005025 | 25 ml |
| | SA005100 | 100 ml |
| | SA005500 | 500 ml |
| | SA00501L | 1 L |
| | SA00510L | 10 L |
| HisCap 6FF | SA005C11 | 1×1 ml |
| | SA005C51 | 5×1 ml |
| | SA005C15 | 1×5 ml |
| | SA005C55 | 5×5 ml |
| | SA005CS | 3×1 ml+1×5 ml |