



Ni NTA Beads HF 重力柱

目录

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

1. 产品介绍

Ni NTA Beads HF 是一种新型固定化金属离子亲和层析 (IMAC) 介质, 整合有非常牢固的 Ni 离子 (产品结构见图 1 所示), 具体性能见表 1。**Ni NTA Beads HF** 是高刚性的琼脂糖微球基质, 较传统工艺可以耐受更高的流速并提供更高的化学稳定性, 广泛用于生物制药和生物工程下游蛋白质和多肽的分离纯化。

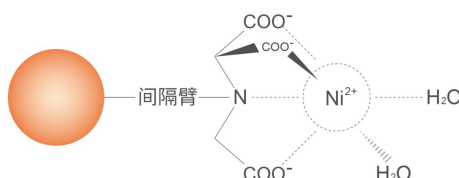


图 1. Ni NTA Beads HF 化学结构示意图

Ni NTA Beads HF 重力柱以 Ni NTA Beads HF 为装填材料, 提供 1 ml 和 5 ml 两种规格产品, 方便客户使用, 操作简单, 纯化效率高。

表 1. Ni NTA Beads HF 产品性能

项目	性能
基质	高流速琼脂糖微球
离子载量	20-30 $\mu\text{mol Ni}^{2+}/\text{ml}$ 介质
微球粒径	85-95 μm
最大压力	0.3 MPa, 3 bar
储存缓冲液	20%乙醇 (2%苯甲醇可选)
储存温度	4-30 $^{\circ}\text{C}$

表 2. Ni NTA Beads HF 试剂耐受

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





2. 纯化流程

2.1 缓冲液的准备

可使用下列推荐缓冲液，也可根据自己的使用习惯配置不同的缓冲液体系，基本原理就是低咪唑上样，高咪唑洗脱，或者高 pH 上样，低 pH 洗脱。缓冲液在使用前最好用 0.22 μm 或者 0.45 μm 滤膜过滤。因为 **Ni NTA Beads HF** 重力柱可以用于可溶蛋白和包涵体蛋白的纯化，两种方法所需缓冲液不同。具体配置方法见表 3、表 4 和表 5。

名称	体积	配方
Lysis Buffer	1 L	50 mM NaH_2PO_4 (7.80 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 300 mM NaCl (17.54 g NaCl) 10 mM imidazole (0.68 g imidazole) 使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0，使用 0.22 或者 0.45 μm 滤膜过滤。
Wash Buffer	1 L	50 mM NaH_2PO_4 (7.80 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 300 mM NaCl (17.54 g NaCl) 20 mM imidazole (1.36 g imidazole) 使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0，使用 0.22 或者 0.45 μm 滤膜过滤。
Elution Buffer	1 L	50 mM NaH_2PO_4 (7.80 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 300 mM NaCl (17.54 g NaCl) 250 mM imidazole (17.0 g imidazole) 使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0，使用 0.22 或者 0.45 μm 滤膜过滤。

表 3. 可溶性组氨酸标签蛋白纯化所需缓冲液及配方

表 4. 包涵体组氨酸标签蛋白纯化所需缓冲液及配方，pH 洗脱方式

名称	体积	配方
Lysis Buffer	1 L	8 M Urea (480.50 g urea) 100 mM NaH_2PO_4 (15.60 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 100 mM Tris-HCl (15.76 g Tris-HCl) 使用 HCl 溶液调节 pH 至 8.0，使用 0.22 或者 0.45 μm 滤膜过滤。
Wash Buffer	1 L	8 M Urea (480.50 g urea) 100 mM NaH_2PO_4 (15.60 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 100 mM Tris-HCl (15.76 g Tris-HCl) 使用 HCl 溶液调节 pH 至 6.3，使用 0.22 或者 0.45 μm 滤膜过滤。
Elution Buffer	1 L	8 M Urea (480.50 g urea) 100 mM NaH_2PO_4 (15.60 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 100 mM Tris-HCl (15.76 g Tris-HCl) 使用 HCl 溶液调节 pH 至 4.5，使用 0.22 或者 0.45 μm 滤膜过滤。

表 5. 包涵体组氨酸标签蛋白纯化所需缓冲液及配方，咪唑洗脱方式

名称	体积	配方
Lysis Buffer	1 L	8 M Urea (480.50 g urea) 50 mM NaH_2PO_4 (7.80 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 300 mM NaCl (17.54 g NaCl) 10 mM imidazole (0.68 g imidazole) 使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0，使用 0.22 或者 0.45 μm 滤膜过滤。
Wash Buffer	1 L	8 M Urea (480.50 g urea) 50 mM NaH_2PO_4 (7.80 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 300 mM NaCl (17.54 g NaCl) 20 mM imidazole (1.36 g imidazole) 使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0，使用 0.22 或者 0.45 μm 滤膜过滤。
Elution Buffer	1 L	8 M Urea (480.50 g urea) 50 mM NaH_2PO_4 (7.80 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 300 mM NaCl (17.54 g NaCl) 250 mM imidazole (17.0 g imidazole) 使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0，使用 0.22 或者 0.45 μm 滤膜过滤。

注：8M Urea 也可以用 6M Guanidine-HCl 替代。表 4 或者表 5 选择其中之一作为包涵体的纯化溶液即可。





2.2 样品准备

2.2.1 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, 7,000 rpm (7,500×g), 离心 15 min 收集菌体, 然后按照菌体: Lysis Buffer=1: 10 (W/V) 加入 Lysis 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介质的结合)。
- 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 RNase A 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, 10,000 rpm (15,000×g), 4℃ 离心 20-30 min。取上清, 置于冰上备用或-20℃ 保存。

2.2.2 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, 5,000 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 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 Buffer 透析后才能加入柱子。

2.2.3 包涵体蛋白纯化(变性条件)

- 1) 将培养液转移到离心杯中, 7,000 rpm (7,500×g), 离心 15 min 收集菌体, 去掉上清。
- 2) 按照菌体:Lysis buffer (不含 8 M 尿素)=1:10 (W/V) 将菌体悬浮起来混匀, 冰浴超声破碎。
- 3) 将破碎液转移至离心管中, 10,000rpm (15,000×g), 4℃ 离心 20-30 min。去掉上清, 步骤 2 和 3 可以重复一次。
- 4) 按照菌体: Lysis buffer (含 8 M 尿素)=1:10 (W/V) 将包涵体悬浮起来。
- 5) 变性条件下进行 His 标签蛋白纯化, 具体缓冲液配方见表 4、表 5。

2.3 样品纯化

Ni NTA Beads HF 重力柱使用请参考以下说明, 各溶液用量均按照柱体积计算 (例如: 2 个柱体积, 1 ml 规格对应为 2 ml 溶液, 5 ml 规格对应为 10 ml 溶液)。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。使用流程请参考图 1。

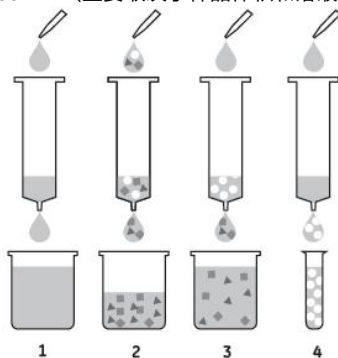


图 1. 使用 Ni NTA Beads HF 重力柱纯化蛋白流程示意图

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

- 1) 将 Ni NTA Beads HF 重力柱固定在铁架台上, 先后打开上盖、下盖, 依靠重力流干保护液。
- 2) 向柱管中加入 5 个柱体积的 Lysis Buffer, 进行平衡, 使填料处于与目的蛋白相同的缓冲体系下, 起到保护蛋白的作用。
- 3) 将样品加到平衡好的重力柱中, 样品保留时间至少 2min, 保证目的蛋白与介质充分接触, 提高目的蛋白的回收率。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, 可以反复上样增加结合效率。
- 4) 用 10-15 倍柱体积的 Wash Buffer 进行清洗, 去除非特异性吸附的杂蛋白, 收集洗杂液。必要时可以调整咪唑的浓度进行洗杂。
- 5) 使用 5-10 倍柱体积的 Elution Buffer 进行目的蛋白的洗脱, 分段收集, 每一个柱体积收集一管, 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 3 倍柱体积的 Lysis Buffer 和 5 倍柱体积的去离子水平衡填料。将重力柱保存在等体积的 20%乙醇中, 置于 2-8℃ 保存, 防止填料被细菌污染。

2.4 SDS-PAGE 检测

将使用纯化产品得到的样品 (包括流出组分、洗杂组分和洗脱组分) 以及原始样品使用 SDS-PAGE 检测纯化效果。

3. 在位清洗

当填料使用过程中发现流速明显减慢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

- 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。
- 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 h。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 min。然后再使用去离子水清洗 10 个柱体积。

4. 填料再生

组氨酸标签蛋白亲和纯化填料所带的镍离子不需要经常整合去除和重新挂镍离子。当填料使用过程中发现颜色变浅，或者填料载量明显变低时，需要进行对填料进行镍离子剥离和重新挂镍离子，也就是填料再生。将填料装填在合适的层析柱内，按照下面操作流程进行镍离子剥离和重新挂镍离子。

- 1) 使用 5 倍柱体积去离子水清洗填料；
- 2) 使用 5 倍柱体积 100 mM EDTA (pH 8.0) 剥落镍离子；
- 3) 使用 10 倍柱体积去离子水清洗填料；
- 4) 使用 0.5 M NaOH 清洗 5 倍柱体积，停留 10-15 min；
- 5) 使用 10 倍柱体积去离子水清洗填料；
- 6) 使用 3-5 倍柱体积 100 mM NiSO₄ 再生挂镍；
- 7) 使用 10 倍柱体积去离子水清洗；

填料再生后，可以立即使用，如不立即使用，需要将填料悬浮于等体积的 20% 乙醇中，置于 2-8℃ 保存。

5. 问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
柱子反压过高	填料被堵塞	按照第 3 部分对填料进行在位清洗。 裂解液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。
	样品太粘稠	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 min。
	缓冲液太粘稠	有机溶剂或者蛋白稳定试剂 (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	可以通过电泳检测裂解液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。
	目的蛋白结合比较弱，在洗杂步骤被洗下来了	提高 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。 使用 10-100 mM EDTA 溶液剥离镍离子，同时得到目的蛋白。
	蛋白降解	在 4℃ 下进行纯化操作。 菌体破碎时添加一些蛋白酶抑制剂。
洗脱组分不纯 (含有多种蛋白)	洗杂操作不彻底	增加 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。
填料颜色变浅或变成白色	镍离子脱落或被剥离	按照第 4 部分填料再生中的建议重新挂镍离子。
填料呈现褐色	缓冲液中含有 DTT 或其他还原剂	参考表 2，建议降低 DTT 的浓度至 2 mM 以下，或者改用巯基乙醇。
上样过程中蛋白发生沉淀	操作温度太高	4℃ 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。

6. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
Ni NTA Beads HF 重力柱	SA101GC01	1 ml
	SA101GC05	5 ml

