兰博利德 LABLEAD
高 新 技 术 企 业

Ni NTA Beads 6FF

货号：N30210

存储条件：4-30℃

技术指标

产品	Ni-NTA Beads 6FF (N30210)
配基	次氮基三乙酸（NTA）
基质	6%高度交联琼脂糖
粒径	90μm
载量/ml	40mg His 标签蛋白
最大耐压	0.3MPa
pH 稳定性	3~12(工作)；2~14（清洗）
耐受性	0.01M HCl、0.1M NaOH 8M 尿素、6M 盐酸胍（一周）； 1M NaOH，70%乙酸（12h）
储存	含 20%乙醇的 1×PBS 2~8℃

1、纯化流程

1.1 Buffer 的准备

Buffer 可使用下列推荐 Buffer，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。Buffer 在使用前最好用 0.22μm 或者 0.45μm 滤膜过滤除菌。因为 Ni NTA Beads FF 可以用于可溶蛋白和包涵体蛋白的纯化，两种方法所需 Buffer 不同，具体配置方法见下表：

可溶性组氨酸标签蛋白纯化所需缓冲液及配方：

名称	体积	配方
Lysis Buffer	1L	50 mM NaH2PO4 （7.80 g NaH2PO4·2H2O） 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 滤膜过滤除菌。
Wash Buffer	1L	50 mM NaH2PO4 （7.80 g NaH2PO4·2H2O） 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 滤膜过滤除菌。
Elution Buffer	1L	50 mM NaH2PO4 （7.80 g NaH2PO4·2H2O） 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 滤膜过滤除菌。

包涵体组氨酸标签蛋白纯化所需缓冲液及配方：

名称	体积	配方
Lysis Buffer	1L	8 M Urea （480.50 g urea） 100 mM NaH2PO4 （15.60 g NaH2PO4·2H2O） 100 mM Tris·HCl （15.76 g Tris·HCl） 使用盐酸溶液调节 pH 至 8.0， 使用 0.22 或者 0.45 μm 滤膜过滤除菌。
Wash Buffer	1L	8 M Urea （480.50 g urea ） 100 mM NaH2PO4 （15.60 g NaH2PO4·2H2O） 100 mM Tris·HCl （15.76 g Tris·HCl） 使用盐酸溶液调节 pH 至 6.3， 使用 0.22 或者 0.45 μm 滤膜过滤除菌。
Elution Buffer	1L	8 M Urea（480.50 g urea） 100 mM NaH2PO4（15.60 g NaH2PO4·2H2O） 100 mM Tris·HCl（15.76 g Tris·HCl） 使用盐酸溶液调节 pH 至 4.5， 使用 0.22 或者 0.45 μm 滤膜过滤除菌。

1.2 样品准备

1.2.1 细菌或酵母表达的蛋白

1、挑取单菌落到 LB 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，7000rpm，离心 15min 收集菌体，然后加入 1/10 体积的 Lysis Buffer 和 PMSF，PMSF 在破碎前加入，最终浓度为 1mM。加入溶菌酶（工作浓度为 0.2-0.4mg/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 10μg/ml RNase A 和 5μg/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，10,000rpm 下，4 度离心 20-30 分钟。取上清，置于冰上备用或-20 度保存。

1.2.2 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，5000rpm 下，离心 10min，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 1×PBS 4℃下透析才能加入柱子。

2、对于大量体积的上清，需加入硫酸氨沉淀浓缩后，蛋白需用 1XPBS 4℃透析后才能加入柱子。

1.2.3 包涵体蛋白纯化(变性条件)

1、将培养液转移到离心杯中，7,000rpm，离心 15min 收集菌体，去掉上清。

2、按照菌体：Lysis buffer=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 下，4 度离心 20-30 分钟。去掉上清，步骤 2）和 3）可以重复一次。

4、按照菌体:**Lysis buffer(含 8M 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。

1.3 Ni NTA Beads 6FF 的装填

Ni NTA Beads 6FF 被广泛应用于工业纯化，因此，涉及到各种中压色谱层析柱的填装，下面介绍使用 Ni NTA Beads 6FF 填装层析柱的方法。

层析柱的装填（使用储液器装填）

1、用去离子水冲洗层析柱底筛板与接头，确保柱底筛板上无气泡，关闭柱底出口，并在柱底部留出 1-2cm 的去离子水。

2、将树脂悬浮起来，小心的将浆液连续地倒入层析柱中。用玻璃棒沿着柱壁倒入浆液可减少气泡的产生。

3、如果使用储液器，应立即在层析柱和储液器中加满水，将进样分配器放置于浆液表面，连接至泵上，避免在分配器或进样管中产生气泡。

4、打开层析柱底部出口，开起泵，使其在设定的流速下进行。最初应让缓冲液缓慢流过层析柱，然后缓慢增加至最终流速，这样可避免液压对所形成柱床的冲击，也可以避免柱床形成的不均匀。如果达不到推荐的压力或流速，可以用你所使用泵的最大流速，这样也可以得到一个很好的装填效果。(注意：在随后的色谱程序中，不要超过最大装柱流速的 75%）当柱床高度稳定后,在最后的装柱流速下至少再上 3 倍柱床体积的去离子水。标上柱床高度。

5、关闭泵，关闭层析柱出口。

6、如果使用储液器，去除储液器，将分配器至于层析柱中。

7、将分配器推向柱子至标记的柱床高度处。允许装柱液进入分配器，锁紧分配器接头。

8、将装填好的层析柱连接至泵或色谱系统中，开始平衡。如果需要可以重新调整分配器。

1.4 样品纯化

Ni NTA Beads 6FF 装填好后，可以用各种常规的中压色谱系统，以 ÄKTA 仪器使用为例介绍其使用方法。

1、将泵管道中注满去离子水。去掉上塞子，将层析柱连接至色谱系统中，打开下出口，将预装柱接到色谱系统中，并旋紧。

2、用 3-5 倍柱体积的去离子水冲洗出储存缓冲液。

3、使用至少 5 倍柱床体积的 Lysis Buffer 平衡色谱柱。

4、利用泵或注射器上样。**注**：样品的粘度增加使得即使上样体积很少，也会导致层析柱很大的反压。上样量不要超过柱子的结合能力。大量的样品体积也可能造成很大的反压，使得进样器更难使用。

5、用 Wash Buffer 冲洗柱子，直到紫外吸收达到一个稳定的基线（一般至少 10-15 个柱体积）。注：在样品和结合缓冲液中加入咪唑可以提高样品纯度。

6、用 Elution Buffer 采用一步法或线性梯度洗脱。一步洗脱中，通常 5 倍柱体积洗脱液就足够了。可以用一个小的梯度，例如 20 倍柱体积或更多，来分离不同结合强度的蛋白质。

1.5 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。

2、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，需进行在位清洗操作（Cleaning-in-Place，CIP)。在位清洗前，先把 Ni^{2+}脱掉（参见 3.填料再生），清洗结束后，将填料保存在 20%乙醇中，后者重新挂镍再保存在 20%乙醇中。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 分钟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 1.5M NaCl 溶液接触时间为 10-15 分钟清洗。然后再使用去离子水清洗 10 个柱体积。

3、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螯合去除和重新挂镍离子。当填料使用过程中发现反压过高，填料上面出现明显的污染，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。

3.1 使用 0.2 M 醋酸溶液（含 6 M GuHCl）清洗 2 倍柱体积；

3.2 使用去离子水清洗 5 倍柱体积；

3.3 使用 2% SDS 清洗 3 倍柱体积；

3.4 使用去离子水清洗 5 倍柱体积；

3.5 使用乙醇清洗 5 倍柱体积；

3.6 使用去离子水清洗 5 倍柱体积；

3.7 使用 100 mM EDTA (pH 8.0)清洗 5 倍柱体积；

3.8 使用去离子水清洗 5 倍柱体积；

3.9 使用 100 mM NiSO4 清洗 5 倍柱体积；

3.10 使用去离子水清洗 10 倍柱体积；

填料再生后，可以立即使用，也可以保存在 20%的乙醇中，置于 4°C 保存。