



Nickle-NTA Agarose Beads 6FF

金属镍高流速琼脂糖亲和介质（NTA）

版本号：V220101

货号：G106

保存：4℃，切勿冻结！

运输：常温

货号	规格
G106-01	10 ml

【产品概述】

本产品是以高度交联的6%琼脂糖凝胶为载体、Ni-NTA为配基组成的介质。可用于分离纯化组氨酸标签（His-tag）蛋白。可以耐受最高0.3 MPa的压力，更加稳定，可以在相对较高的流速下，实现对目的蛋白的纯化。适用于工业大规模蛋白的纯化。介质的载量因蛋白不同而有所差异，一般每ml介质可结合>40 mg 6×His-tagged 标签蛋白。该介质可再生后重复使用数次。

【产品组分】

组分名称	G106-01
Nickle-NTA Agarose Beads 6FF	10 ml

保存缓冲液成分：含20%乙醇的1×PBS。琼脂糖微珠悬浮于保护液中，含量为50%（V/V）。

【保存条件】

4℃保存，保质期24个月；**切勿冻结！**

【实验准备】

1. 纯化 Buffer 的配置

Buffer 可根据自己的使用习惯配置不同的缓冲液体系，也可使用下面推荐的 Buffer。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。可以用于可溶蛋白和包涵体蛋白的纯化，但纯化所用的 Buffer 不同。具体方法如表 1、表 2。

表 1. 可溶性 His-tag 蛋白纯化所使用的缓冲液配方

名称	配方
Binging Buffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 300 mM NaCl 10 mM 咪唑 用 NaOH 将 pH 调至 8.0
Wash Buffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 300 mM NaCl 20 mM 咪唑 用 NaOH 将 pH 调至 8.0
Elution Buffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 300 mM NaCl 250 mM 咪唑 用 NaOH 将 pH 调至 8.0

表 2. 包涵体 His-tag 蛋白纯化所使用的缓冲液配方

名称	配方
Binging Buffer	8 M Urea 100 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 100 mM Tris-HCl 用盐酸将 pH 调至 8.0
Wash Buffer	8 M Urea 100 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 100 mM Tris-HCl 20 mM 咪唑 用盐酸将 pH 调至 6.3
Elution Buffer	8 M Urea 100 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 100 mM Tris-HCl 250 mM 咪唑 用盐酸将 pH 调至 4.5

注意：Buffer 在使用前用 0.22 μm 滤膜过滤除菌

2. 样品准备

1) 细菌或酵母表达的蛋白：

- A. 蛋白表达结束后，将培养液转移到离心杯中，7,000 rpm 离心 15 min，弃除培养液收集菌体，然后加菌体体积 10 倍（W/V）的 Binding buffer（含 PMSF，浓度为 1 mM，或其他蛋白酶抑制剂）。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)。

B. 将菌体沉淀重悬, 加入10 µg/ml的RNase A和5 µg/ml的DNase I, 混匀, 放置于冰上, 然后冰上超声破碎细胞, 至菌液澄清。

C. 将菌体破碎液转移至离心管中, 10,000 rpm下, 4°C离心20-30 min。取上清, 置于冰上备用或-20°C保存。

2) 酵母、昆虫细胞和哺乳动物细胞分泌表达的可溶性蛋白

A. 将细胞培养液转移至离心杯, 5,000 rpm离心10 min, 取上清。如上清中不含EDTA、组氨酸和还原剂等物质, 可直接上样至Ni-NTA Agarose层析柱; 如上清中含有EDTA、组氨酸和还原剂等物质, 需要用Binding Buffer在4°C下透析后才能上样至Ni-NTA Agarose层析柱。

B. 对于大体积的上清, 需要加入硫酸铵沉淀浓缩后, 并采用Binding Buffer在4°C透析后才能上样至Ni-NTA Agarose层析柱。

3) 包涵体蛋白

A. 培养液在7,000 rpm离心15 min收集菌体沉淀, 弃除上清。按照菌体: Binding Buffer (不含尿素或盐酸胍) =1:10 (W/V) 将菌体重悬混匀, 冰上超声破碎。将菌体破碎液转移至离心管中, 10,000 rpm, 4°C离心20-30 min, 弃除上清, 可重复上述操作一次。

B. 按照菌体 (包涵体) :Binding Buffer (含8 M尿素) =1:10 (W/V) 将包涵体重悬, 在变性条件下纯化His标签蛋白。

3. 层析柱装填 (使用储液器装填)

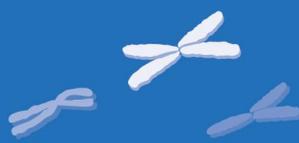
Ni-NTA Agarose Beads 6FF广泛用于工业级纯化, 因此, 会涉及到各种中低压层析柱的装填, 请参考如下方案:

- 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1-2 cm的去离子水。
- 2) 将填料悬浮起来, 小心的将填料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, 连接至进样泵上, 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, 开起进样泵, 使其在设定的流速下进行。最初应采用低流速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。

【操作步骤】-层析柱

Ni-NTA Beads 6FF 装填好后, 可以用于各种常规的中压层析系统, 以ÄKTA 仪器使用为例介绍其使用方法:

1. 将ÄKTA层析系统的泵和管道中注满去离子水。去掉层析柱上塞子, 并将层析柱连接至层析系统中, 打开层析柱下出口并连接到层析系统中, 连接处旋紧防止漏液;
2. 用3-5倍柱体积的去离子水冲洗层析柱, 排除层析柱中的存储缓冲液;
3. 用5-10倍柱体积的Binding Buffer平衡层析柱;
4. 利用注射器或系统上样泵上样。上样量不要超过柱子的结合能力。
注: 若样品粘度较高, 即使上样体积很少也会导致层析柱反压过大。大体积的样品上样也可能造成层析柱反压过大, 使得进样器更难使用。
5. 使用Wash Buffer冲洗层析柱, 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Binding Buffer中加入一定浓度的咪唑可以提高纯化后样品纯度。
6. 用Elution Buffer洗脱目的蛋白, 采用一步法 (固定咪唑浓度) 或线性梯度洗脱。一步法时通常5倍柱体积即可。也可以使用一个小的咪唑浓度梯度, 采用20倍柱体积, 来分离不同结合强度的蛋白质。选择合适的收集体积, 分步收集洗脱液, 得到纯化后的目的蛋白。
7. 纯化效果检测: 将蛋白纯化过程中得到的样品 (包括上样流穿液、Wash 流穿液、分步洗脱液) 以及裂解后的原始样品, 都用 SDS-PAGE 检测纯化效果。通过分析 SDS-PAGE 结果, 调整 Wash Buffer 和 Elution Buffer 中的咪唑组分浓度。



【介质再生】

组氨酸标签蛋白亲和和纯化介质所带的镍离子不需要经常重新挂镍离子。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。仅用于相同蛋白分子纯化时重复使用。

1. 使用0.2 M 醋酸溶液（含6 M GuHCl）清洗，2倍柱体积；
2. 使用去离子水清洗，5倍柱体积；
3. 使用2% SDS清洗，3倍柱体积；
4. 使用去离子水清洗，5倍柱体积；
5. 使用乙醇清洗，5倍柱体积；
6. 使用去离子水清洗，5倍柱体积；
7. 使用100 mM EDTA（pH8.0）清洗，5倍柱体积；
8. 使用去离子水清洗，5倍柱体积；
9. 使用100 mM NiSO₄清洗，5倍柱体积；
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℃保存。

【附注】样品中所含化学物质可接受浓度参考表

还原剂	5 mM DTE 0.5-1 mM DTT 20 mM β-mercaptoethanol 5 mM TCEP 10 mM reduced glutathione	去污剂	2% Triton™ X-100 (nonionic) 2% Tween™ 20 (nonionic) 2% NP-40 (nonionic) 2% Cholate (anionic) 1% CHAPS (zwitterionic)	缓冲液	50 mM sodium phosphate, pH 7.4 100 mM Tris-HCl, pH 7.4 100 mM Tris-acetate, pH 7.4 100 mM HEPES, pH 7.4 100 mM MOPS, pH 7.4 100 mM sodium acetate, pH 4
变性剂	8 M Urea 6 M Gua-HCl	其他类	500 mM imidazole 20% ethanol 50% glycerol 100 mM Na ₂ SO ₄	其他类	1.5 M NaCl 1 mM EDTA 60 mM citrate

【常见问题分析及其解决方案】

问题	可能原因	解决方案
柱子反压过高	填料被堵塞	裂解液中含有微小的固体颗粒，建议上柱前使用滤膜（0.22 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 min。
	样品太粘稠	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	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。
洗脱组分不纯（含有多种蛋白）	蛋白降解	使用10-100 mM EDTA溶液剥离镍离子，同时得到目的蛋白。
	洗杂不彻底	增加 Wash Buffer 体积。
填料呈现褐色	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。
	缓冲液中含有DTT等还原剂	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。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任，仅限于此产品的价值本身。