

Ni NTA Agarose Beads 6FF (QS01002)

目录

一、 产品简介	1
二、 纯化工艺	
1. 可溶性、内分泌 His 标签蛋白纯化	1
2. 可溶性、外分泌 His 标签蛋白纯化	2
3. 包涵体、内分泌 His 标签蛋白纯化	2
三、 在位清洗 (CIP)	4
四、 填料再生	4
五、 问题处理	5
六、 试剂兼容性表	5
七、 订购信息	6

一、 产品简介

千株松的Ni NTA Agarose Beads 6FF (QS01002) 是一种6%高度交联的琼脂糖球，它与螯合剂共价偶联，通过四个配位键结合 Ni^{2+} ，用于多组氨酸标签重组蛋白的高亲和力纯化。Ni NTA Agarose Beads 6FF 具有低 Ni^{2+} 泄漏、高结合能力和良好的化学稳定性，能与蛋白质纯化中使用的各种化学添加剂相兼容。这使得Ni NTA Agarose Beads 6FF成为高效纯化His标签蛋白的填料。

表 1. Ni NTA Agarose Beads 6FF 的特点

球型基质	6% 高交联度琼脂糖
平均粒径	90 μm (45-165 μm)
动态载量 (DBC)	≥ 50 mg His标签蛋白/mL沉降树脂
存储方案	20% 乙醇
存储温度	2-8 $^{\circ}\text{C}$ 储存。

二、 纯化工艺

1. 可溶性、内分泌His标签蛋白纯化

用具有高纯度的水和化学品配置缓冲溶液。建议在使用前通过0.45 μm 过滤器过滤缓冲液。

表 2. 在天然条件下纯化多组氨酸标签蛋白所需的缓冲液和配方

名称	体积	配方
----	----	----

裂解平衡缓冲液 (LE 缓冲液)	1 L	50 mM NaH ₂ PO ₄ (7.80 g NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O) 300 mM NaCl (17.54 g NaCl) 用氢氧化钠溶液调节 pH 至 8.0
洗杂缓冲液	1 L	50 mM NaH ₂ PO ₄ (7.80 g NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O) 300 mM NaCl (17.54 g NaCl) 10 mM 咪唑 (0.68 g 咪唑) 用氢氧化钠溶液调节 pH 至 8.0
洗脱缓冲液	1 L	50 mM NaH ₂ PO ₄ (7.80 g NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O) 300 mM NaCl (17.54 g NaCl) 250 mM 咪唑 (17.0 g 咪唑) 用氢氧化钠溶液调节 pH 至 8.0

制备样品

- 通过在4 °C , 5000 rpm离心5分钟, 从50 mL 培养物中收获细胞。
- 在8 mL的 LE 缓冲液中重新悬浮细胞, 并添加适量的PMSF 或其他蛋白酶抑制剂。
注: 抑制剂必须对 Ni²⁺ 树脂的能力没有影响。
- 在冰上对溶液进行超声波处理1秒, 冷却时间为3秒。总超声时间约为 30 至 45 分钟。
可选: 如果裂解液太粘, 加入RNase A (10 µg/mL) 和DNaseI (5 µg/mL) 并在冰上孵育10-15分钟。
- 将裂解液在4 °C, 12,000 rpm离心15 min以沉淀细胞碎片。
- 将上清液添加到含有镍填料的色谱柱上。

2. 可溶性、外分泌His标签蛋白纯化

如果培养基上清液中不含EDTA、组氨酸或任何其他可能影响镍填料的还原剂, 则可以直接上样。否则, 请执行以下步骤。在将样品上样到色谱柱上之前, 用1×PBS对样品进行透析。对于大体积的上清液, 通过硫酸铵沉淀浓缩蛋白质, 用1×PBS透析溶解的蛋白质溶液, 然后将溶液上样到含有镍填料的色谱柱上。

色谱柱准备

- 轻轻颠倒瓶子数次以完全悬浮树脂来混合浆料。
- 将适量的浆液转移到色谱柱中。让树脂沉淀下来, 让储存缓冲液从柱子中排出。
- 用4倍床体积的LE缓冲液平衡色谱柱或直到A280稳定。

色谱柱纯化

- 以每分钟 0.5-1 mL的流速将含有目标多组氨酸标记蛋白的透明样品加样在色谱柱上。收集并保存流通以进行分析。
- 用8倍柱体积的洗涤缓冲液洗涤色谱柱, 或直到A280在1 mL/min的流速下稳定。以每分钟0.5-1mL的流速, 用5至10倍柱体积的洗脱缓冲液洗脱多组氨酸标签蛋白。
- 根据目标蛋白的具体应用, 收集洗脱液并用20 mM Tris-HCl, pH 8.0或1×PBS, pH 7.4进行透析。

3. 包涵体、内分泌His标签蛋白纯化

缓冲液配置

用高纯度的水和化学品配置缓冲液。建议在使用前通过0.45 μ m的过滤器过滤缓冲区。

表 3. 在变性条件下纯化大肠杆菌包涵体所需的缓冲液及其配方

名称	体积	配方
裂解平衡缓冲液(LE 缓冲液)	1 L	100 mM NaH ₂ PO ₄ (15.60 g NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O) 10 mM Tris·Cl (1.21 g Tris, add 980mL dd H ₂ O, Adjust pH to 8.0 with HCl, Volume to 1000 mL.) 8 M Urea (480.50 g urea) Adjust pH to 8.0 with NaOH
洗杂缓冲液	1 L	100 mM NaH ₂ PO ₄ (15.60 g NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O) 10 mM Tris·Cl (1.21 g Tris, add 980mL dd H ₂ O, Adjust pH to 8.0 with HCl, Volume to 1000mL.) 8 M Urea (480.50 g urea) 10 mM 咪唑 (0.68 g 咪唑) Adjust pH to 8.0 with NaOH
洗脱缓冲液	1 L	100 mM NaH ₂ PO ₄ (15.60 g NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O) 10 mM Tris·Cl (1.21 g Tris, add 980mL dd H ₂ O, Adjust pH to 8.0 with HCl, Volume to 1000mL.) 8 M Urea (480.50 g urea) 250 mM 咪唑 (17.0 g 咪唑) Adjust pH to 8.0 with NaOH

包涵体溶解

- 1) 4°C, 用 1×PBS (每毫升约 7.5 mL 固体) 重悬菌体, 按上述方法超声破碎细胞。
- 2) 4°C, 12,000 rpm 离心 10 分钟, 收集包涵体。如有必要, 用 1×PBS 多次清洗包涵体。

- 3) 将包涵体溶解于LE 缓冲液(约 7.5 mL/mL 固体)中, 室温孵育 30-60 分钟。为了使固体颗粒完全溶解, 可能需要均质化或超声波化。
- 4) 离心 12,000 转/分, 30 分钟, 去除任何剩余的不溶性物质。

色谱柱纯化

- 1) 小心地将上清液转移到干净的管中, 并将其加载到用 LE 缓冲液预平衡的 Ni²⁺柱上。
- 2) 用 LE 缓冲液清洗色谱柱, 直到 A280 达到基线并稳定。
- 3) 用2倍柱体积的洗涤缓冲液洗涤柱。
- 4) 以每分钟 0.5-1mL 的流速, 用 5 至 10 倍柱体积的洗脱缓冲液洗脱多组氨酸标签蛋白。
- 5) 根据目标蛋白的具体应用, 收集洗脱液并用20 mM Tris-HCl, pH8.0或 1×PBS, pH7.4进行透析。

注: 此处推荐的方案是从包涵体中纯化目标蛋白, 因此从该过程中洗脱的蛋白可能需要重新折叠以获得活性和可溶性蛋白。

SDS-PAGE分析

- 1) 纯化后进行SDS-PAGE 分析。从纯化后的样品和原样品中取适量样品(包括洗脱组分、洗涤组分和洗脱组分), 分别与上样缓冲溶液混合制样, 然后进行凝胶电泳。
- 2) 用 SDS-PAGE 检测纯化后的产品与原始样品得到的样品(包括洗脱组分、洗涤组分、洗脱组分)的纯化效果。

三、 在位清洗 (CIP)

1. 当反压过高或预装柱在使用过程中出现明显的污染时, 需要在位清洗(CIP)操作。建议按照以下步骤去除填料上的残留污染物, 如沉淀蛋白、疏水蛋白和脂蛋白。
2. 去除强疏水结合蛋白, 脂蛋白和脂类该类型污染物可通过10倍柱体积的30%异丙醇洗涤5-10次, 洗涤时间15-20分钟去除。
3. 然后用 10倍柱体积的去离子水冲洗柱子。您也可以选择使用含去污剂的酸性或碱性溶液, 以2倍柱体积清洗预装柱。例如 0.1 M 含 0.1 - 0.5%非离子洗涤剂的醋酸溶液, 接触时间为1-2小时。洗涤剂处理后, 需要用 70%的乙醇洗涤 5×床柱体积, 以完全去除洗涤剂。
4. 最后, 用10倍柱体积的去离子水冲洗柱子。

四、 填料再生

为了使柱子中填料完全再生, 用以下溶液清洗填料:

1. 2倍柱体积 6 M 盐酸胍或者8 M尿素, 0.2 M 醋酸
2. 5倍柱体积去离子水
3. 3倍柱体积 2% SDS 溶液
4. 5倍柱体积去离子水
5. 5倍柱体积 100% EtOH

6. 5倍柱体积去离子水
7. 5倍柱体积 100mM EDTA (pH 8)
8. 5倍柱体积去离子水
9. 5倍柱体积 100 mM NiSO₄ 溶液
10. 10倍柱体积去离子水
11. 长期保存, 树脂应储存在 2 - 8°C 的 20%乙醇中。

五、 问题处理

问题	可能原因	解决方法
纯化的多组氨酸标记蛋白的产量很低或无法检测。	由于蛋白质折叠, 多组氨酸标签不会暴露。	尝试变性条件下纯化。
	表达水平过低。	优化表达条件。
	蛋白上样量不足	提高蛋白上样量
	过于严格的洗涤把蛋白质洗掉了。	使用 LE Buffer 代替 Wash Buffer 来清洗树脂。
	重组蛋白对树脂有很高的亲和力。	通过以下方式增加洗脱条件的剧烈性, 降低 pH 或增加咪唑浓度。 使用 EDTA 或 EGTA (10-100 mM) 去除树脂中的镍离子并洗脱蛋白质。
	蛋白质被降解。	在 4°C 下执行所有纯化步骤并使用蛋白酶抑制剂。
在洗脱蛋白中观察到多条条带。	树脂洗涤不好。	用更多柱体积的洗涤缓冲液洗涤。
		尝试 pH 梯度洗脱或咪唑梯度洗脱。
	样本中还有其它富组氨酸蛋白。	在洗脱步骤之前, 尝试使用较低 pH 值 (pH 4 和 pH 6 之间) 的高严格性缓冲液进行额外洗涤。
		尝试 pH 梯度洗脱或咪唑梯度洗脱。 使用其他类型树脂进行二次纯化
柱子变成白色	缓冲液中的螯合试剂将镍离子从柱上剥离。	如第 2 页 (色谱柱的再生) 中所述, 用 Ni ²⁺ 重新填充色谱柱。

六、 试剂兼容性表

还原试剂	1 mM DTT
	20 mM β-ME
	5mM TCEP-HCl

	10 mM 还原型谷胱甘肽
还原剂	6 M Gua·HCl [†]
	8 M Urea [†]
去污剂	2% Triton X-100
	2% Tween 20
	50% glycerin
盐	4 M MgCl ₂
	5 mM CaCl ₂
	2 M NaCl
	100mM Na ₂ SO ₄
其它	50% glycerol
	20% ethanol
	1 mM EDTA [‡]
	60 mM citrate [†]

七、 订购信息

产品名称	货号
HP Ni TED Agarose Beads 6FF	QS01004
Ni IDA Agarose Beads 6FF	QS01001
Ni NTA Agarose Beads 6FF	QS01002
Ni TED Agarose Beads 6FF	QS01003
Co-NTA Agarose Beads 6FF	QS01005
Co-TED Agarose Beads 6FF	QS01006