

# Ni NTA Beads His标签蛋白纯化琼脂糖凝胶

## 目录

1. 产品介绍.....	1
2. 纯化流程.....	2
3. 在位清洗.....	4
4. 填料再生.....	4
5. 问题及解决方案.....	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配位的氮川三乙酸 (NTA)，螯合镍离子 (Ni<sup>2+</sup>) 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，这样的结构很有效的保护了镍离子免受小分子的进攻 (产品结构见图 1 所示，产品结构见图 1 所示，三种产品结构的区别)，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、变性剂或耦合剂等苛刻条件 (见表 2)，适用性更广，配体更稳定，选择性更高。

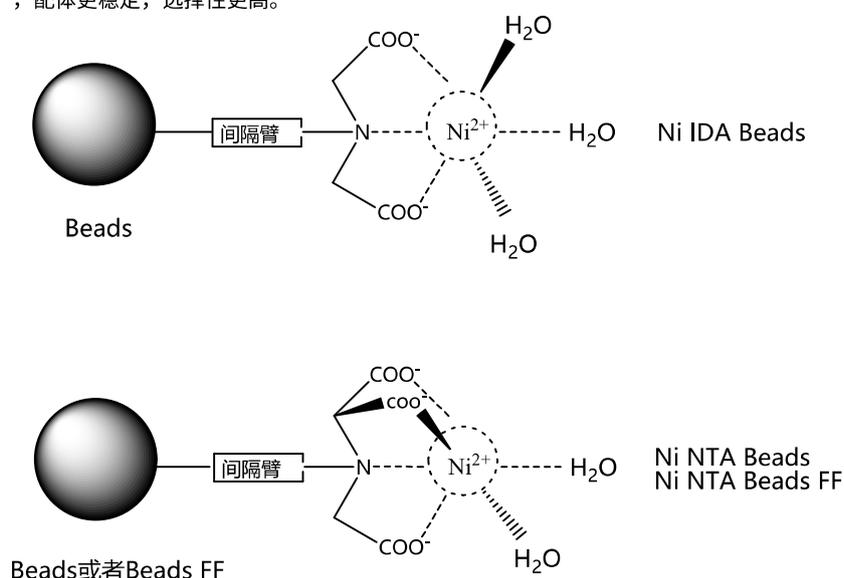


图 1. Ni IDA Beads, Ni NTA Beads 和 Ni NTA Beads 6FF 化学结构示意图

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 介质
微球粒径	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	4-30℃

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
	10 mM reduced glutathione
变性剂	8 M urea
	6 M Gua-HCl

表 2. Ni NTA Beads 试剂耐受情况 (续表)

试剂种类	浓度
去污剂	2% Triton™ X-100 (nonionic)
	2% Tween™ 20 (nonionic)
	2% NP-40 (nonionic)
	2% Cholate (anionic)
	1% CHAPS (zwitterionic)
其他类	500 mM imidazole
	20% ethanol
	50% glycerol
	100 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	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, 介质的耐受性能可能会进一步下降。

## 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** 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。

表 3. 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	1 L	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (7.80 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (7.80 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> 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	1L	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (7.80 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> 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 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	1L	8 M Urea (480.50 g urea)
		100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (15.60 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> 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	1L	8 M Urea (480.50 g urea)
		100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (15.60 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (15.60 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (7.80 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> 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。

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 (续表)

名称	体积	配方
Wash Buffer	1 L	8 M Urea (480.50 g urea)
		50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (7.80 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (7.80 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> 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。

## 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 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 °C 离心 20-30 min。取上清, 置于冰上备用或-20°C 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, 10,000 rpm(15,000×g), 4 °C 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 Ni NTA Beads 重力柱的装填

- 1) 取合适规格的重力层析柱, 装入下垫片, 加入适量纯水润洗柱管和垫片, 关闭下出口。
- 2) 将 Ni NTA Beads 混合均匀, 用枪头吸取适量浆液加入至重力柱中 (介质实际体积占悬液的一半), 打开下出口流干保护液。
- 3) 加入适量纯水冲洗介质, 待柱管中液体重力流干后, 关闭下出口。
- 4) 装入润洗后的上垫片, 确保垫片与填料之前没有空隙, 且保持水平。
- 5) 装填好的重力柱可以直接加入平衡液进行平衡, 暂不使用时则加入保护液, 4-30°C 保存。

## 2.4 样品纯化流程

### 2.4.1 孵育法纯化

- 1) 根据纯化的样品量, 取适量 Ni NTA Beads 加入离心管中, 1000 rpm 离心 1 min, 吸弃上清; 也可加入重力柱中, 流干保护液。
- 2) 向离心管中加入 5 倍介质体积的 Lysis Buffer 清洗介质, 1000 rpm 离心 1 min, 吸弃上清; 如使用重力柱, 则直接在重力柱中清洗, 直接重力流干 Lysis Buffer; 重复两次以上。
- 3) 加入样品, 封闭离心管或重力柱管, 4°C 振荡孵育 2-4 h 或者 37°C 孵育 30 min-2 h。
- 4) 孵育结束后, 1000 rpm 离心 1 min, 吸弃上清, 或过滤收集介质, 上清保留作为流穿, 用于电泳鉴定。
- 5) 用 5 倍介质体积的 Wash Buffer 清洗介质, 1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管过滤, 去除上清 (注意不要吸到介质), 重复 3-5 次, 中间建议更换新离心管。必要时可以调整咪唑的浓度进行洗杂。
- 6) 加入 3-5 倍柱体积的 Elution Buffer 进行洗脱, 室温孵育 10-15 min, 1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管收集洗脱液, 可重复 2-3 次。

### 2.4.2 重力柱法纯化

- 1) 将装填好的 Ni NTA Beads 重力柱用 5 倍柱体积 Lysis Buffer 进行平衡, 使填料处于与目的蛋白相同的缓冲液体系下, 重复 2-3 次。

- 2) 将样品加到平衡好的重力柱中，样品保留时间至少 2 min，保证样品和介质充分接触，收集流出液，可以反复上样增加结合效率。
- 3) 用 10-15 倍柱体积的 Wash Buffer 进行洗杂，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。
- 4) 使用 5-10 倍柱体积的 Elution Buffer 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。

上述步骤介质洗脱结束后，先用 Lysis Buffer 冲洗 3 倍柱体积，然后用纯水冲洗 5 倍柱体积，再用 20%乙醇冲洗 2 个柱体积，然后将介质置于 2-8°C 保存。

### 2.5 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。

## 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 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螯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) 使用去离子水清洗填料，直至 pH 中性；
- 6) 使用 3-5 倍柱体积 100 mM NiSO<sub>4</sub> 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 4-30°C 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 0.45μm）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 <sup>2+</sup> （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 10-100mM EDTA 溶液剥离镍离子，同时得到目的蛋白。
	蛋白降解	在 4°C 下进行纯化操作。 菌体破碎时添加一些蛋白酶抑制剂。

(续表)

问题	原因分析	推荐解决方案
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	对 Ni IDA Beads, 不能耐受 DTT, 建议换用 Ni NTA Beads 或者 Ni NTA Beads 6FF。对于 Ni NTA Beads 或者 Ni NTA Beads FF, 建议降低 DTT 的浓度至 2mM 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°C 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。