



Ni NTA BeadsHis 标签蛋白纯化填料

产品货号：WL-NI001-01

产品规格：10ml

储存条件：4°C-30°C

储存缓冲液：1XPBS（含 20%乙醇）

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四配位的氮川三乙酸（NTA），螯合镍离子（ Ni^{2+} ）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，这样的结构能够有效地保护镍离子免受小分子的进攻，性能更加稳定。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，适用性更广，配体更稳定，选择性更高。

产品特性：

参数	指标
基质	4%琼脂糖凝胶
配基	氮川三乙酸（NTA）
形状	八面体结构
微球粒径（ μm ）	45–165
载量	>40mg 6XHis-tagged protein
推荐流速	
最高耐压	0.1 MPa, 1 bar

纯化流程：

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 滤膜过滤除菌。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，具体配置方法见下表：

名称	可溶性蛋白纯化所需缓冲液及配方	包涵体蛋白纯化所需缓冲液及配方（pH 洗脱方式）	包涵体蛋白纯化所需缓冲液及配方（咪唑洗脱方式）
Lysis Buffer (1L)	50mM NaH_2PO_4 300 mM NaCl 10 mM imidazole NaOH 溶液调节 pH 至 8.0	8 M Urea 100 mM NaH_2PO_4 100 mM Tris HCl 盐酸溶液调节 pH 至 8.0	8 M Urea 50 mM NaH_2PO_4 300 mM NaCl 10 mM imidazole NaOH 溶液调节 pH 至 8.0



Wash Buffer (1L)	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 20 mM imidazole NaOH 溶液调节 pH 至 8.0	8 M Urea 100 mM NaH ₂ PO ₄ 100 mM Tris HCl 盐酸溶液调节 pH 至 6.3	8 M Urea 50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 20 mM imidazole NaOH 溶液调节 pH 至 8.0
Elution Buffer (1L)	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 250 mM imidazole NaOH 溶液调节 pH 至 8.0	8 M Urea 100 mM NaH ₂ PO ₄ 100 mM Tris HCl 盐酸溶液调节 pH 至 4.5	8 M Urea 50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 250 mM imidazole NaOH 溶液调节 pH 至 8.0

2. 样品准备

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，7,000rpm(7,500×g)，离心 15min 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 1mM 的 PMSF。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，然后冰浴超声破碎细胞，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(15,000×g)，4 度离心 20-30 分钟。取上清，置于冰上备用或-20 度保存。

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，5,000rpm(3,800×g)，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 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。

2.3 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(7,500×g)，离心 15min 收集菌体，去掉上清。
- 2) 按照菌体:Lysis buffer（不含 8M 尿素或 6M 盐酸胍）=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 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。

3. 样品纯化

- 1) 将 Ni NTA Beads 装入合适的层析柱，层析柱用 5 倍柱体积的 Lysis Buffer（可参考表 3 和表 4 的配方）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。
- 2) 将样品加到平衡好的 Ni NTA Beads 中，保证目的蛋白与 Ni²⁺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。

3) 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。

4) 使用 5-10 倍柱体积的 Elution Buffer，收集洗脱液，即目的蛋白组分。

5) 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。将填料保存在等体积的 20%乙醇中，置于 4-30℃ 保存，防止填料被细菌污染。

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。

5. 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 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。

6. 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 0.5M NaOH 清洗 5 倍柱体积，停留 10-15min；
- 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 4-30℃ 保存。