

Ni NTA 高速层析介质 (6FF)

Ni NTA Beads 6FF

货号	规格
BDTL0012-10	10ml
BDTL0012-50	50ml
BDTL0012-100	100ml

1. 产品介绍

Ni NTA 高速层析介质 (6FF) 是以高度交联的 6% 琼脂糖凝胶为基质，配体与 Ni NTA Beads 相同 (产品结构见图 1 所示)，具体性能见表 1。该层析介质除了可以耐受苛刻的试剂条件外 (见表 2)，因其耐压的基质，可以耐受最高 0.3 MPa 的压力，更稳定，因此该产品更适合用于工业大规模蛋白的纯化，可以在相对较高的流速下，实现对目的蛋白的纯化。

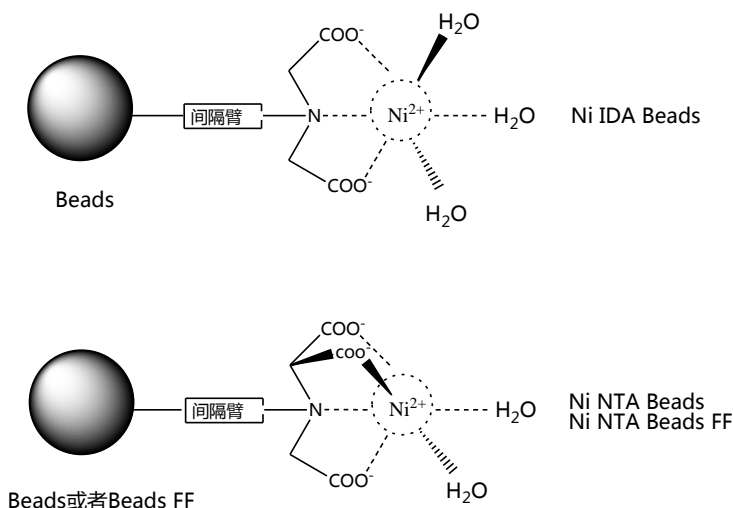


图 1. Ni IDA Beads, Ni NTA Beads 和 Ni NTA Beads FF 化学结构示意图

表 1. Ni NTA Beads 6FF 与 Ni NTA Beads 产品性能对比

	Ni NTA Beads	Ni NTA Beads 6FF
基质	4% 琼脂糖凝胶	高度交联的 6% 琼脂糖凝胶
载量 (/mL 基质)	>40mg 6XHis-tagged protein	>40mg 6XHis-tagged protein
微球粒径 (μm)	45-165	45-165
最大压力	0.1 MPa, 1 bar	0.3 MPa, 3 bar
pH 稳定范围	短时间 (至少 2h) 4-9; 长时间 (一周内) 4-9	短时间 (至少 2h) 2-14; 长时间 (一周内) 3-12
储存缓冲液	20% 乙醇	20% 乙醇
工作温度	4-30°C	4-30°C

表 2. Ni NTA 层析介质 (6FF) 可耐受试剂及浓度

试剂种类	浓度
还原剂	5 mM DTE
	5 mM DTT
	20 mM β -mercaptoethanol
	5 mM TCEP
	10 mM reduced glutathione
变性剂	8 M urea
	6 M Gua-HCl
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 ₂ SO ₄
	1.5 M NaCl
	1 mM EDTA
缓冲液	60 mM citrate
	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	

2. 纯化流程

2.1 Buffer 的准备

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 0.22 μ m 或者 0.45 μ m 滤膜过滤除菌。因为 Ni 层析介质 (NTA) 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，具体配置方法见表 3 和表 4。

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	1L	50 mM NaH ₂ PO ₄ (6.90 g NaH ₂ PO ₄ H ₂ 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 滤膜过滤除菌。
Wash Buffer	1L	50 mM NaH_2PO_4 (6.90 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 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 滤膜过滤除菌。
Elution Buffer	1L	50 mM NaH_2PO_4 (6.90 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 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 滤膜过滤除菌。

表 4. 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 NaH_2PO_4 (13.80 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 100 mM Tris Cl (12.10 g Tris Cl) 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 NaH_2PO_4 (13.80 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 100 mM Tris Cl (12.10 g Tris Cl) 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 NaH_2PO_4 (13.80 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 100 mM Tris Cl (12.10 g Tris Cl) 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。

2.2 样品准备

2.2.1 细菌或酵母表达可溶性蛋白

1. 挑取单菌落到 LB 培养基中，根据载体，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 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层析介质的结合。
3. 将菌体沉淀悬浮起来，（如果菌液浓度高，也可考虑加入 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNaseA 和 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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，15,000rpm 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20-30 分钟。取上清，置于冰上备用或 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

3 / 7

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，5,000rpm 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. 对于大体积上清，日需加硫酸氨沉淀浓缩，蛋白还需用 1×PBS 4℃ 透析后才能加入柱子。

2.3 Ni NTA 高速层析介质（6FF）的装填

Ni NTA 高速层析介质（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装填。

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。

2.4 样品纯化流程

层析介质装填好后，可以用各种常规的中压色谱系统，以 ÄKTA 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。

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

当层析介质使用过程中发现反压过高（大于 0.5Mpa）或者层析介质上面出现明显污染时，需要进行在位清洗操作（Cleaning-in-Place, CIP）。在位清洗前，先把 Ni²⁺脱掉（参见 4.层析介质再生），清洗结束后，将层析介质保存在 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层析介质上残留的污染物，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，清洗层析介质 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

1.5M NaCl 溶液接触时间为 10-15 分钟，再使用去离子水清洗 10 个柱体积。

4. 层析介质再生

His 标签蛋白亲和纯化层析介质所带的镍离子不需要经常整合去除和重新挂镍离子。当层析介质使用过程中发现反压过高（大于 0.5MPa），层析介质上面出现明显的污染，或者层析介质载量明显变低时，需要进行对层析介质进行镍离子剥离和重新挂镍离子，也就是层析介质再生。将层析介质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 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 (pH 8.0)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；

11. 再生的层析介质，可以立即使用，也可以保存在 20%的乙醇中，置于 4℃。

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	层析介质被堵塞	裂解液中含有微小的固体颗粒，建议上柱前使用滤膜（0.2 or 0.45 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 分钟。
	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。
	缓冲液太粘稠	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。
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	优化表达条件，使用包涵体纯化缓冲体系。
	表达量太低	提高wash Buffer的pH，或者降低咪唑浓度。
	目的蛋白结合比较弱，在洗杂步骤被洗下来了	降低Elution Buffer的pH值，或者增加Elution Buffer中咪唑浓度。
	目的蛋白结合过强，不容易洗脱下来	使用10-100mM EDTA溶液剥离镍离子，同时得到目的蛋白。 在4℃下进行纯化操作。
	蛋白降解	菌体破碎时添加一些蛋白酶抑制剂。 增加 Wash Buffer 体积。
洗脱组分不纯（含有多种蛋白）	洗杂不彻底	通过调节pH值，或者咪唑浓度来优化洗杂条件。
	样品中含有其他的组氨酸标签蛋白	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。
层析介质颜色变浅或变成白色	镍离子脱落或被剥离	室温下进行上样。
层析介质呈现褐色	缓冲液中含有DTT等还原剂	参考表2，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。

6. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
Ni 层析介质 (IDA)	BDTL0010-25	25ml
	BDTL0010-250	250ml
Ni 层析介质 (NTA)	BDTL0011-10	10ml
	BDTL0011-50	50ml
	BDTL0011-100	100ml
Ni 层析介质 (NTA) 重力预装柱套装	BDTL0011-K	套
Ni NTA 高速层析介质 (6FF)	BDTL0012-10	10ml
	BDTL0012-50	50ml
	BDTL0012-100	100ml
Ni NTA 高速层析介质 (6FF) 预装柱	BDTL0012-11	1×1ml
	BDTL0012-51	5×1ml
	BDTL0012-15	1×5ml
	BDTL0012-55	5×5ml
	BDTL0012-3115	3×1ml+1×5ml