



HisPur Ni NTA kit

目录

1. 产品介绍.....	1
2. 纯化流程.....	2
3. 在位清洗.....	2
4. 问题及解决方案.....	3
5. 订购信息及相关产品.....	3

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，这样的结构保护了镍离子免受小分子的进攻 (产品结构见图 1 所示)，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、变性剂或螯合剂等苛刻条件 (见表 2)，适用性更广，配体更稳定，选择性更高。

HisPur Ni NTA kit 提供 3ml **Ni NTA Beads** 重力预装柱和组氨酸标签蛋白纯化所需的缓冲液，方便客户使用，操作简单，纯化效率高。试剂盒详细组分见表 3。

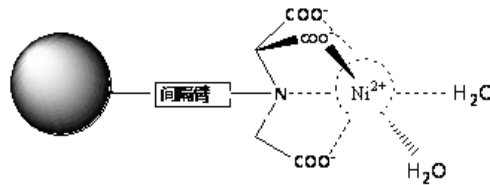


图 1. Ni NTA Beads 产品化学结构示意图

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 基质
粒径范围	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	2–8 °C

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
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
60 mM Citrate	

注: 如果溶液中含有上述两种以上的试剂, 介质的耐受性可能会进一步下降。





表 3. HisPur Ni NTA Kit 试剂盒组分

组分名称	货号	规格	数量
HisPur Ni NTA Column	SA004GC03	3 ml	1
His-tag Lysis/Wash Buffer	SLB013100	100 ml	2
His-tag Elution Buffer	SLB014100	100 ml	1

2. 纯化流程

2.1 样品准备

2.1.1 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, 7000 rpm(7,500×g), 离心 15 min 收集菌体, 然后按照菌体: Lysis/Wash Buffer=1: 10 (W/V) 加入 Lysis/Wash 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 μg/ml RNaseA 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, 10000 rpm(15,000×g), 4℃离心 20-30 min。取上清, 置于冰上备用或-20℃保存。

2.1.2 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, 5000 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/Wash 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/Wash Buffer 透析后才能加入柱子。

2.2 样品纯化

HisPur Ni NTA kit 提供 1 根填充 3 ml Ni NTA Beads 的重力预装柱 (HisPur Ni NTA Column), 2 瓶 100 ml 的 Lysis/Wash Buffer 和 1 瓶 100 ml 的 Elution Buffer。不要再进行填料填充和缓冲液配制。整个纯化流程大约需要 30 min (主要取决于样品体积和溶液的粘稠性), 操作快捷。使用时参考下面操作说明。

- 1) 将 HisPur Ni NTA Column 固定在铁架台上, 依次去掉下端塞和上端塞, 流干预装柱的保护液。
- 2) 向柱管中加入 5 ml Lysis/Wash Buffer, 平衡柱子, 流干后, 再重复 2 次, 共使用 15 ml Lysis/Wash Buffer。
- 3) 将处理好的样品加入柱管, 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。
- 4) 加入柱管加入 5 ml Lysis/Wash Buffer, 进行洗杂, 去除非特异性吸附的杂蛋白, 收集洗杂液目的与收集流出液的目的相同, Lysis/Wash Buffer 流干后, 再重复 5 次, 共使用 30 ml Lysis/Wash Buffer。
- 5) 使用 15-30 ml 的 Elution Buffer 进行洗脱目的蛋白, 分段收集, 每 5 ml 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。
- 6) 依次使用 5 ml Lysis/Wash Buffer 和 5 ml 去离子水交替平衡填料, 重复 2 次, 最后再用 5 ml 20%的乙醇平衡填料, 重复 1 次, 然后添加 5 ml 20%的乙醇到柱管中, 置于 4℃保存, 防止填料被细菌污染。

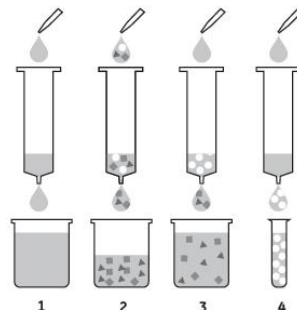


图 2. 使用 HisPur Ni NTA Column 纯化蛋白流程示意图

Step 1: 柱子平衡; Step 2: 上样; Step 3: 洗杂; Step 4: 洗脱

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 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 1.5 M NaCl 溶液清洗 10-15 分钟。然后，再使用去离子水清洗 10 个柱体积。

4. 问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
柱子流速慢	填料被堵塞	样品中含有微小的固体颗粒，建议上柱前使用滤膜（0.22或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。
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，使用包涵体纯化缓冲体系。
	目的蛋白结合比较弱，在洗杂步骤被洗下来了	提高Lysis/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。 10-100 mM EDTA溶液剥离镍离子，同时得到目的蛋白。
洗脱组分不纯（含有多种蛋白）	蛋白降解	菌体破碎时添加一些蛋白酶抑制剂。 在 4℃ 下进行纯化操作。
	洗杂不彻底	增加Lysis/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	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。

5. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
Ni NTA Beads	SA004005	5 ml
	SA004025	25 ml
	SA004100	100 ml
	SA004500	500 ml
	SA00401L	1 L
	SA00410L	10 L
HisPur Ni NTA kit	SA004K03	3 次
Ni NTA Beads 6FF	SA005005	5 ml
	SA005025	25 ml
	SA005100	100 ml
	SA005500	500 ml
	SA00501L	1 L
	SA00510L	10 L
HisCap 6FF	SA005C11	1×1 ml
	SA005C51	5×1 ml
	SA005C15	1×5 ml
	SA005C55	5×5 ml
	SA005CS	3×1 ml+1×5 ml

