

HisSep Ni-NTA Agarose Resin 6FF

His 标签蛋白琼脂糖高速纯化树脂

产品信息

产品名称	产品编号	规格
HisSep Ni-NTA Agarose Resin 6FF (His 标签蛋白琼脂糖高速纯化树脂)	20503ES10	10 mL
HisSep Ni-NTA Agarose Resin 6FF (His 标签蛋白琼脂糖高速纯化树脂)	20503ES50	50 mL
HisSep Ni-NTA Agarose Resin 6FF (His 标签蛋白琼脂糖高速纯化树脂)	20503ES60	100 mL
HisSep Ni-NTA Agarose Resin 6FF (His 标签蛋白琼脂糖高速纯化树脂)	20503ES60	1000 mL

产品描述

HisSep Ni-NTA Agarose Resin 6FF 以高度交联的 6% 琼脂糖凝胶为基质, 通过化学方法偶联四配位的氮川三乙酸 (NTA) 为配体, 螯合镍离子 (Ni^{2+}) 后, 形成非常稳定的八面体结构, 镍离子处于八面体的中心, 这样的结构可保护镍离子免受小分子的进攻, 更加稳定, 可以耐受一定浓度的还原剂、变性剂或耦合剂等苛刻条件。此外, 因其基质的耐压性 (可耐受最高 0.3 MPa 的压力), 该产品可以用于工业大规模蛋白的纯化, 可在相对较高的流速下, 实现对目的蛋白的纯化。

产品性质

基质 (Matrix)	高度交联的 6% 琼脂糖凝胶
粒径 (Bead size)	45-165 μm
载量 (Capacity)	>40 mg 6×His-tagged protein/mL 基质
耐压 (Tolerance Pressure _{max})	0.3 MPa, 3 bar
储存缓冲液 (Buffer)	含 20% 乙醇的 1×PBS

运输和保存方法

冰袋运输。4°C 保存。有效期 2 年。

注意事项

为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用方法

一、纯化流程

1 缓冲液的准备

缓冲液使用原理: 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 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤除菌。可溶性组氨酸标签蛋白纯化所需配方详见附表 2。包涵体组氨酸标签蛋白纯化所需缓冲液及配方详见附表 3。

2 样品准备

2.1 细菌表达的蛋白 (本说明以细菌表达的蛋白纯化为例)

- 1) 挑取单菌落到含有适合抗性的 LB 培养基中, 根据载体说明加入相应的诱导剂诱导相应的时间。
- 2) 表达结束后, 将培养液转至离心瓶, 7000 rpm, 离心 15 min, 收集菌体, 然后加入 1/10 体积的裂解液 (Lysis buffer) 和 PMSF (PMSF 在破碎前加入, 其浓度为 1 mM), 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) 之后加入溶菌酶, 使其工作浓度为 1 mg/mL。【注】如果表达的宿主细胞内含 pLysS 或 pLysE, 可以不加入溶菌酶。
- 4) 将菌体沉淀悬浮起来 (如果菌液浓度高, 可考虑加入 10 $\mu\text{g/mL}$ RNase A 和 5 $\mu\text{g/mL}$ DNase I), 混匀, 置于冰上超声破碎细胞, 至菌液基本保持澄清。

5) 收集上述澄清蛋白液至离心管中, 10000 rpm, 4°C离心 20-30 min。取上清, 置于冰上备用或-20°C保存。

2.2 酵母、昆虫和哺乳细胞分泌表达的可溶性蛋白

将细胞培养液转移至离心瓶, 5000 rpm 离心 10 min, 收集上清。如上清中不含 EDTA、组氨酸和还原剂等, 即可直接上柱纯化; 如含有 EDTA、组氨酸和还原剂等物质, 则需用 1×PBS 4°C下透析后方可上柱。

【注】对于大量体积的上清, 需加入硫酸铵进行沉淀浓缩, 之后经 1×PBS 4°C下透析后上柱。

2.3 包涵体蛋白纯化 (以细菌为例)

- 1) 将培养液转移至离心瓶, 7000 rpm, 离心 15 min, 收集菌体去上清。
- 2) 按照菌体: 裂解液=1:10 (w/v) 的比例将菌体充分悬浮, 混匀, 冰浴超声破碎。
- 3) 将破碎液转移至离心管, 10000 rpm, 4°C离心 20-30 min, 去上清。可重复步骤 2) 和 3) 一次。
- 4) 按照菌体: 裂解液 (含 8M 尿素) =1:10 (w/v) 的比例将包涵体充分悬浮。
- 5) 变性条件下纯化 His 标签蛋白纯化。

3 装柱

- 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 1-2 cm 的去离子水。
- 2) 将树脂悬浮, 小心地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, 开启泵, 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。如达不到推荐的压力或流速, 可以用所用泵的最大流速, 这样也可以达到一个较好的装填效果。当柱床高度稳定后, 在最后的装柱流速下至少再上 3 倍柱体积的去离子水。标上柱床高度。【注】在随后的色谱程序中, 不要超过最大装柱流速的 75%。
- 5) 关闭泵, 关闭层析柱出口。
- 6) 如使用储液器, 去除储液器, 将分配器置于层析柱中。
- 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。如需要可重新调整分配器。

4 样品纯化

装柱后, 可用各种常规的中压色谱系统, 以 AKTA 使用为例进行说明:

- 1) 将泵管道注满去离子水。去掉产品上塞, 连接至色谱系统中, 打开下出口, 将纯化柱连接到色谱系统中, 注意旋紧。
- 2) 3-5 倍柱体积去离子水冲洗纯化柱。
- 3) 至少 5 倍柱体积的 Lysis Buffer 平衡色谱柱。1ml 规格预装柱推荐流速为 1 mL/min, 5 mL 预装柱推荐流速为 5 mL/min。
- 4) 利用泵或注射器上样, 收集流出液, 以便 SDS-PAGE 检测蛋白结合情况。【注】若样品粘度增加, 即使上样体积很少也会导致层析柱很大反压; 上样量不要超过柱子的结合能力; 大量样品体积也可能造成很大的反压, 使得进样器更难使用。
- 5) Wash Buffer 平衡柱子, 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低浓度咪唑可以提高样品纯度。
- 6) Elution Buffer 一步法或梯度法进行洗脱。一步法洗脱中一般 5 倍柱体积洗脱液即可。梯度洗脱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。
- 7) 建议用更高浓度咪唑 (如 500 mM) 彻底清洗纯化柱上结合的杂蛋白。随后依次用 3 倍柱体积的 Lysis Buffer 和 5 倍柱体积的去离子水清洗树脂。5 倍柱体积的 20%乙醇平衡树脂, 最后将树脂保存在 20%乙醇的 1×PBS 中, 置于 4°C保存。

5 SDS-PAGE 检测

将纯化过程中得到的样品 (包括原始样品、流出组分、洗杂及洗脱组分等) 利用 SDS-PAGE 进行检测, 判定其纯化效果。

二、在位清洗

当填料使用过程中发现反压过高 (>0.5 Mpa) 或者填料上面出现明显的污染时, 需对其进行在位清洗 (Cleaning-in-Place, CIP)。在位清洗时, 先把 Ni²⁺脱掉, 清洗结束后, 将填料保存在 20%乙醇中, 后者重新挂 Ni 后再保存在 20%乙醇中。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。

1 去除强疏水结合的蛋白, 脂蛋白和脂类

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。之后再用去离子水清洗 10 倍柱体积。也可以选择使用含有去污剂的酸性或者碱性溶液清洗填料 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, 需用 70% 的乙醇清洗 5 倍柱体积, 彻底去除去污剂。最后利用去离子水清洗 10 倍柱体积。

2 去除离子作用结合的蛋白

使用 1.5 M NaCl 溶液接触 10-15 min, 之后用去离子水清洗 10 倍柱体积。

三、填料再生

当填料使用过程中发现反压过高 (>0.5 Mpa), 填料上面出现明显的污染, 或填料载量明显变低时, 需要对其进行镍离子剥离及重新挂镍处理, 即填料再生。按照下面操作流程进行:

- 1) 使用 5 倍柱体积去离子水清洗填料;
- 2) 使用 5 倍柱体积 100mM 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 100mM NiSO₄ 再生挂镍;
- 7) 去离子水清洗 10 倍柱体积。

填料再生后, 可立即使用, 也可保存在 20% 乙醇中, 置于 4°C 备用。

相关产品

20502ES10	HisSep Ni-NTA Agarose Resin (His 标签蛋白琼脂糖纯化树脂)	10 mL
20502ES50	HisSep Ni-NTA Agarose Resin (His 标签蛋白琼脂糖纯化树脂)	50 mL
20502ES60	HisSep Ni-NTA Agarose Resin (His 标签蛋白琼脂糖纯化树脂)	100 mL
20504ES08	HisSep Ni-NTA 6FF Chromatography Column, 5ML (His 标签蛋白纯化预装柱, 5ML)	5 mL
20504ES25	HisSep Ni-NTA 6FF Chromatography Column, 5ML (His 标签蛋白纯化预装柱, 5ML)	5×5 mL
20505ES03	HisSep Ni-NTA 6FF Chromatography Column, 1ML (His 标签蛋白纯化预装柱, 1ML)	1 mL
20505ES08	HisSep Ni-NTA 6FF Chromatography Column, 1ML (His 标签蛋白纯化预装柱, 1ML)	5×1 mL

附表 1 HisSep Ni-NTA Agarose Resin 试剂耐受情况

试剂种类	浓度
还原剂	5 mM DTE 0.5-1 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
缓冲液	50 mM sodium phosphate, pH7.4 100 mM Tris-HCl, pH7.4 100 mM Tris-acetate, pH7.4 100 mM HEPES, pH7.4 100 mM MOPS, pH7.4 100 mM sodium acetate, pH7.4

附表 2 可溶性 His 标签蛋白纯化所需缓冲液及配方

缓冲液名称	配方	配制 1L 溶液所需各种试剂量
Lysis Buffer, pH8.0	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM imidazole NaOH 调 pH 至 8.0, 0.22 μ m 或 0.45 μ m 过滤除菌	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O 7.8 g NaCl 17.54 g Imidazole 0.68 g
Wash Buffer, pH8.0	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 20 mM imidazole NaOH 调 pH 至 8.0, 0.22 μ m 或 0.45 μ m 过滤除菌	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O 7.8 g NaCl 17.54 g Imidazole 1.36 g
Elution Buffer, pH8.0	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 250 mM imidazole NaOH 调 pH 至 8.0, 0.22 μ m 或 0.45 μ m 过滤除菌	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O 7.8 g NaCl 17.54 g Imidazole 17.0 g

附表 3 包涵体 His 标签蛋白纯化所需缓冲液及配方

缓冲液名称	配方	配制 1L 溶液所需各种试剂量	
Lysis Buffer, pH8.0	8 M Urea 100 mM NaH ₂ PO ₄ 100 mM Tris·HCl 盐酸溶液调 pH 至 8.0, 0.22 μm 或 0.45 μm 过滤除菌	Urea NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O Tris	480.5 g 15.6 g 15.76 g
Wash Buffer, pH6.3	8 M Urea 100 mM NaH ₂ PO ₄ 100 mM Tris·HCl 盐酸溶液调 pH 至 6.3, 0.22 μm 或 0.45 μm 过滤除菌	Urea NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O Tris	480.5 g 15.6 g 15.76 g
Elution Buffer, pH4.5	8 M Urea 100 mM NaH ₂ PO ₄ 100 mM Tris·HCl 盐酸溶液调 pH 至 4.5, 0.22 μm 或 0.45 μm 过滤除菌	Urea NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O Tris	480.5 g 15.6 g 15.76 g

附表 4 问题及解决方案

问题	可能原因	推荐解决方案
柱子反压过高	填料被堵塞	裂解液中可能含微小的固体颗粒, 建议上柱前使用滤膜 (0.22 μm 或 0.45 μm) 过滤, 或离心去除。 样品中含高浓度的核酸, 延长破碎时间直至粘度降低, 或添加 DNaseI (终浓度为 5 μg/mL), Mg ²⁺ (终浓度 1 mM), 冰上孵育 10-15 min
	样品太黏稠	有机试剂或蛋白稳定剂 (如甘油等) 可能会引起反压增高, 降低操作流速。
洗脱组分中无目的蛋白	蛋白可能是包涵体	可通过电泳检测裂解液, 分析上清中是否有目的蛋白, 包涵体蛋白需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, 在洗杂步骤中已被洗下来	提高 Wash Buffer 的 pH 值, 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, 或者增加 Elution Buffer 中的咪唑浓度 使用 10-100 mM EDTA 溶液剥离镍离子, 同时得到蛋白
	蛋白降解	菌体破碎时需添加一些蛋白酶抑制剂 在 4°C 下进行纯化操作
洗脱组分不纯 (含多种蛋白)	洗杂不彻底	增加 Wash Buffer 体积
	样品中含有其他 His 标签蛋白	通过调节 pH 值或咪唑浓度来优化洗杂条件。再使用其他纯化手段 (如去离子交换, 疏水等) 进一步纯化洗脱组分。
填料颜色变浅或变成白色	镍离子脱落或者剥离	按照填料再生的操作重新挂镍离子
填料呈现褐色	缓冲液中含有 DTT 等还原剂	参考附 3 适当降低还原剂 DTT 的浓度, 或改用巯基乙醇
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	在样品和所有缓冲液中添加稳定剂, 如 0.1% Triton X-100 或 Tween-20