

## Ni NTA Sepharose 6FF 的重力柱说明书

货号: AC17628

规格: 1\*1mL / 1\*5mL / 5\*1mL / 3\*1mL+1\*5mL / 5\*5mL

保存: 2-8°C

### 产品说明:

**Ni NTA Sepharose 6FF (IMAC)** 是利用 Ni<sup>2+</sup>与蛋白质侧链上的某些氨基酸(主要为组氨酸、半胱氨酸、色氨酸)相互作用而进行分离纯化, 适用于 His 标签蛋白及与 Ni<sup>2+</sup>具有相互作用的生物分子的分离纯化。

特点如下:

- 快速、简单 (一步纯化)。
- 使用范围广、操作简单。
- 相对于 Ni -TED Beads 6FF 来说, 结合载量大、试剂兼容性广。

表 1: 介质性能参数

基质	高度交联 6%的琼脂糖
粒径范围	45-165μm
平均粒径	90μm
结合载量	40mg(His 标签蛋白)/ml(介质)
pH 稳定性*	3-12 (长期) 2-14 (短期)
化学稳定性*	0.01M 盐酸、0.01M 氢氧化钠 (一周) 1M 氢氧化钠、70%乙醇(12 小时) 2% SDS (1 小时) 30% 异丙醇 (30 分钟)
兼容性	所有在 Ni-6FF (IMAC) 中正常使用的溶液
流速	600cm/h
操作压力	≤0.3MPa
贮存溶液	20%乙醇

\*: 此处稳定性指的是在未螯合金属离子时介质的稳定性。

表 2: 常用试剂兼容性

缓冲液	0.05M sodium phosphate, pH 7.4、 0.1M Tris-HCl, pH 7.4、 0.1M Tris-acetate, pH 7.4 0.1M HEPES, pH 7.4、 0.1M MOPS, pH 7.4、 0.1M sodium acetate, pH 4
变性剂	8M Urea、 6M Gua-HCl
去污剂	2% Triton X-100、 2% Tween 20、 2% NP-40、 2% Cholate、 1% CHAPS
还原剂*	0.005M DTE、 0.005M DTT、 0.02M β-mercaptoethanol、 0.005M TCEP、 0.01M reduced glutathione
其它添加剂	0.5M Imidazole、 20% Ethanol、 50% Glycerol、 0.1M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 、 1.5M NaCl、 0.001M EDTA**、 0.06M Citrate

\*: Ni NTA Sepharose 6FF (IMAC) 在使用过程中, 允许在样品和纯化溶液中加入低浓度的还原剂, 但在不使用时

切不可用含有还原剂的溶液长时间浸泡或保存。

\*\*：Ni NTA Sepharose 6FF (IMAC)在使用过程中，允许在小体积样品中加入极低浓度的金属离子螯合剂（例如 0.001M EDTA），但不得在纯化溶液中加入或者加载大体积含螯合剂的样品

## 纯化流程：

### 1、Buffer 的准备

溶液配制（如果是包涵体纯化，在下述平衡液、洗杂液、洗脱液中添加 8M 尿素或 6M 盐酸胍）

平衡液：0.02M PB、0.5M NaCl，调节 pH 7.4，室温保存。

备注：平衡液中 NaCl 是为了抑制介质的离子交换作用。

洗杂液：0.02M PB、0.5M NaCl、0.02-0.04M 咪唑，调节 pH 7.4，室温保存。

备注：根据最终使用需求（优先考虑的是纯度，还是收率），在洗杂液中加入 0.02-0.04M 咪唑（优先考虑回收率）或者直接在平衡液中加入 0.02-0.04M 咪唑（优先考虑纯度）。

洗脱液：0.02M PB、0.5M NaCl、0.5M 咪唑，调节 pH 7.4，室温保存。

备注：一般情况下，洗脱液中咪唑浓度在 0.05-0.25M 即可洗脱下目标蛋白。

### 2、样品准备

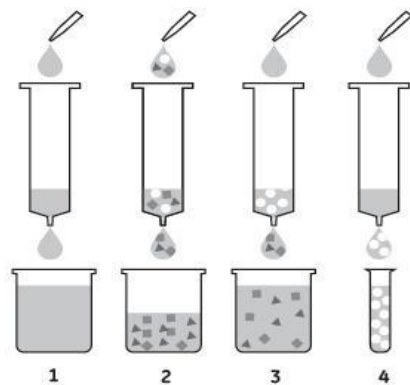
上柱之前要确保样品溶液有合适的离子强度和 pH 值，可以用结合/洗杂缓冲液对血清样品、腹水或细胞培养液稀释，或者样品用结合/洗杂缓冲液透析。

样品在上样前建议离心或用 0.22 $\mu$ m 或 0.45 $\mu$ m 滤膜过滤，减少杂质，提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

备注：蛋白的结合能力随着裂解物类型、目标蛋白性质、流速、pH 变化而变化，低流速常常能增加样本的结合效率。

### 3、样品纯化

Ni NTA Focurose 6FF 重力柱使用请参考以下说明，各溶液用量均按照柱体积计算（柱体积是指填料体积）。使用流程请参考下图。



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

1) 水洗：将 Ni NTA Focurose 6FF 重力柱固定在铁架台上，依次去掉上端塞和下端塞，使液体流出。当柱内剩余液面略高于上筛板，向管中加入 5-10 个柱体积的去离子水，去除残留的保护液。

2) 平衡：当液面略高于上筛板，向柱管中加入 5 个柱体积的平衡液，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。

3) 上样：将样品加到平衡好的重力柱中，样品保留时间至少 2min，保证目的蛋白与介质充分接触，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。

4) 洗杂：用 10-15 倍柱体积的洗杂液进行清洗，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液。

5) 洗脱: 使用 5-10 倍柱体积的洗脱液进行目的蛋白的洗脱, 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。

6) 水洗: 依次使用 3 倍柱体积的平衡液和 5 倍柱体积的去离子水平衡填料。将重力柱保存在等体积的 20%乙醇中, 置于 2-8°C 保存, 防止填料被细菌污染。

#### 4、SDS-PAGE 检测

将纯化过程中收集的样品 (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。

##### 填料清洗

清洗后可以去除一些强结合性物质 (例如一些强结合的蛋白、变性蛋白、脂类等), 从而达到恢复介质的优良性能 (例如载量、流动性、柱效等)。

建议每使用 5-10 次后进行一次清洗, 具体清洗频率需根据纯化的初始样品的洁净度进行调整。

A、用 5-10 倍柱体积纯化水冲洗。

备注: 用于去除洗脱液 (使用后直接清洗) 或 20%乙醇 (使用前清洗)。

B、用 5-10 倍柱体积 0.02M Tris-HCl、0.1M EDTA, pH8.0 冲洗, 再用 5-10 倍柱体积纯化水冲洗备。

备注: 用于脱  $Ni^{2+}$

C、用 5-10 倍柱体积 1.0 M NaOH 冲洗, 静置 1.0 小时后再用纯化水冲洗至中性。

备注: 用于清洗一些聚集在介质上的蛋白沉淀、脂类等物质。

D、用 5-10 倍柱体积 0.1 M  $NiSO_4$  冲洗, 静置 0.5 小时后再用 5-10 倍柱体积纯化水冲洗。

备注: 用于螯合  $Ni^{2+}$

E、用 5-10 倍柱体积的 20%乙醇冲洗后保存。

备注: 备注: 20%乙醇可以防止微生物的生长, 20%乙醇保存的介质储存在 2-8 °C。

##### 常见问题

表 1: 常见问题及解决方案

问题	可能原因	解决方案
纯化时目标物不与介质结合或结合量较低	1.上样量过载	降低上样量
	2.上样速度过快	降低上样流速
	3.蛋白或脂类在介质中聚集影响结合	及时有效地清洗介质或更换新的介质
	4.表达条件过于剧烈, His 标签被包裹, 不能与介质结合	建议做一个空载体作为表达和纯化的对照, 确定表达条件是否合适
	5.初始样品中没有组氨酸标签蛋白	通过基因序列或 His 标签抗体核实
	6.目标蛋白出现在流穿中	目标蛋白没有成功表达或样品和平衡液中 pH 和组分不正确
	1.目标物没有与介质结合或结合量较少	先确认目标物是否与介质结合
	2.洗脱条件不合适	加大洗脱液中咪唑浓度
	3.洗脱时间不够	降低流速, 延长洗脱液的保留时间

洗脱时没有收集到目标物 或只收集到少量目标物	4.洗脱体积过小	加大洗脱体积
	5.洗脱液中洗脱能力太弱	加大洗脱液中咪唑浓度
	6.洗杂时, 目的蛋白被洗下来	降低洗杂液中的咪唑浓度
	7.目标物在洗脱液条件下出现聚集沉淀	检测目标物在洗脱液条件 (pH 和盐浓度) 下的溶解度和稳定性。可以尝试在洗脱液中加入一些添加剂: 如 0.2%TritonX-100 或 0.5%Tween20
目标物纯度较低	1.样品没有经过前处理	样品上柱前必须要经过离心或过滤
	2.样品粘度过高	用平衡液适当的稀释样品, 降低粘度
	3.洗杂不彻底	加大洗杂体积直至基线平稳并与平衡液一致
	4.杂质蛋白或脂类在介质中聚集沉淀	及时有效地清洗介质
	5.杂质与 Ni <sup>2+</sup> 具有较高的亲和力。	用其它类型介质进行纯化 (如离子或分子筛)
	6.目标物出现降解	检测目标物的稳定性并加入蛋白酶抑制剂
	7.柱料装填效果不佳	重新装填或购买
	8.杂质与介质出现非特异性吸附	适当选择添加剂降低非特异性吸附, 可以尝试在样品中加入一些添加剂: 如 0.5%TritonX-100、1.0% Tween20 或 50%甘油
	9.分离柱顶部有较大储样体积	重新装柱或降低储样体积
	10.介质中有微生物生长	介质使用完后, 请及时正确保存介质
介质载量下降	1.上样速度过快	降低上样流速
	2.蛋白或脂类在介质中聚集, 导致载量下降。	及时清洗介质
	3.使用次数过多	更换新介质
	4.表达条件过于剧烈, His 标签被包裹, 不能较好与介质结合	建议做一个空载体作为表达和纯化的对照, 确定表达条件是否合适
色谱峰上升缓慢	介质装填过紧	重新装柱
色谱峰拖尾	介质装填太松	重新装柱
柱床有裂缝或干涸	出现泄露或大体积气泡引入	检查管路是否有泄露或气泡, 重新装柱
液流较慢	1.蛋白或脂类聚集	及时清洗介质或滤膜
	2.蛋白沉淀在介质中	调整平衡液和洗脱液组分, 以维持目标物的稳定性和介质的结合效率
	3.分离柱中微生物生长	所用试剂必须经过过滤和脱气; 样品上柱前必须离心或过滤