

Ni-IDA 琼脂糖纯化树脂

货号: Cat.No: P5101 Size: 5ml Resin (Total 10ml); Cat.No: P5102 Size: 25ml Resin (Total 50ml)

产品介绍

新赛美的 Ni-IDA 琼脂糖纯化树脂是一种预装了镍离子 (Ni^{2+}) 的亲和层析介质。采用高度交联的 6%琼脂糖凝胶作为基质，并共价偶联了亚氨基二乙酸 (IDA) 作为螯合配基。IDA 以三个配位键与 Ni^{2+} 结合，形成稳定的平面四边形结构，从而高效、特异地与蛋白上的组氨酸标签结合，适用于大肠杆菌、酵母、昆虫细胞和哺乳动物细胞等多种表达来源的 His 标签蛋白纯化。

技术参数

参数	指标
基质	高度交联的 6%琼脂糖凝胶 (6FF)
配基	亚氨基二乙酸 (IDA)
粒径范围	45-165 μm
平均粒径	90 μm
动态结合载量	>40 mg 6×His 标签蛋白 (25KD) / ml 树脂
最大耐压	0.3 MPa (3 bar)
储存缓冲液	含 20%乙醇的 1×PBS
储存温度	2-8° C, 切勿冷冻

纯化流程

缓冲液准备

所有缓冲液须用高纯水配制，使用前建议用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤。

推荐使用的缓冲液配方:

缓冲液	配方	PH(NaOH 调节)
平衡缓冲液	50 mM NaH_2PO_4 , 0.5 M NaCl, 10 mM 咪唑	8.0
漂洗缓冲液	50 mM NaH_2PO_4 , 0.5 M NaCl, 20 mM 咪唑	8.0
洗脱缓冲液	50 mM NaH_2PO_4 , 0.5 M NaCl, 250mM 咪唑	8.0

缓冲液注意事项:

建议在含 0.5~1.0 M NaCl 的缓冲液中进行结合，中性至弱碱性 pH 7~8 条件效果最佳，常用磷酸钠缓冲液

也可使用 Tris-HCl 缓冲液，但在金属-蛋白质亲和力较弱时应避免使用，因其可能降低结合强度

缓冲液中应避免螯合剂如 EDTA 或柠檬酸盐

最好避免使用 β -巯基乙醇、DTT 等还原剂，以免还原 Ni^{2+} 导致填料变色

样品准备

可溶性蛋白样品: 细胞裂解后离心 (12,000 rpm, 4°C, 20~30 分钟)，上清用 0.22 或 0.45 μm 滤膜过滤后上样

包涵体蛋白样品: 在所有缓冲液中加入 6 M 盐酸胍或 8 M 尿素

样品缓冲液应尽可能与平衡缓冲液一致

根据介质载量和料液中目标蛋白含量计算进料量

细胞裂解与样品澄清

裂解方法: 常用方法包括超声破碎或高压匀浆。为防止蛋白降解，裂解缓冲液中建议加入适量的蛋白酶抑制剂。如果样品中核酸过多导致粘稠，可加入 DNase I (终浓度 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 和 Mg^{2+} (终浓度 1 mM)，冰上孵育 10-15 分钟以降低粘度。

澄清处理 (非常关键): 裂解后，必须彻底去除细胞碎片等不溶物，以防堵塞柱子。建议首先以 10,000-15,000×g 的离心力，在 4°C 下离心 20-30 分钟，取上清。为确保效果，上清液最好再通过 0.45 μm (或 0.22 μm) 的滤膜过滤

以下是使用预装柱进行纯化的一般步骤。

准备: 将所有试剂恢复至室温。根据说明书建议的柱体积 (CV) 计算各缓冲液用量。

平衡: 用 5-10 个柱体积的平衡缓冲液 (不含或含低浓度咪唑，如 10mM) 冲洗层析柱，直至流出液的 pH 和电导率与平衡液一致。

上样：将处理好的样品以适中流速（推荐 60-100 cm/h）加入层析柱，使目标蛋白与 Ni^{2+} 充分结合。建议收集流穿液以备分析。

洗涤：上样后，用 10-15 个柱体积的洗涤缓冲液（平衡液中加入 10-40mM 咪唑）清洗柱子，去除非特异性结合的杂蛋白。

洗脱：用 5-10 个柱体积的洗脱缓冲液（平衡液中加入高浓度咪唑，如 250-500mM）将目标蛋白竞争下来。建议分段收集洗脱液（例如每 1 个柱体积收集一管），以便后续通过 SDS-PAGE 等分析确定目标蛋白所在组分。

再生与保存

再生前的准备与注意事项

在进行再生操作前，请确认以下事项：

保证每步洗完后的都要用足够的去离子水冲洗至中性，避免使用氢氧化钠（NaOH）直接清洗 Ni-IDA 柱，因为 NaOH 会使镍离子沉淀出来，造成柱头变色和对柱子的损害；Ni-IDA 柱适合用再生方法处理，而非强碱清洗，再生后应重新挂镍方可使用。

当以下情况出现时，建议进行彻底再生：

结合能力显著下降

镍离子渗漏明显

非特异性吸附增加

已接触过螯合剂（如 EDTA）或高浓度还原剂（如 DTT、TCEP）

再生操作：

- （1）从层析柱下端流干所有溶液
- （2）用 2 倍柱体积的 0.2 M Acetic Acid / 6 M Guanidine HCl 洗涤
- （3）用 2 倍柱体积的去离子水洗涤
- （4）用 3 倍柱体积的 2% SDS 洗涤
- （5）依次用 1 倍柱体积 50%、5 倍柱体积 的 100%乙醇进行梯度洗涤
- （6）再依次用 1 倍柱体积 的 25%乙醇洗涤
- （7）用 1 倍柱体积的去离子水 洗涤
- （8）用 5 倍柱体积的 0.1 M EDTA (pH 8.0) 洗涤
- （9）用 3 倍柱体积的去离子水 洗
- （10）用 5 倍柱体积的 100 mM $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 洗涤（或 100 mM NiCl_2 ）
- （11）用 10 倍柱体积的平衡缓冲液, 洗去游离镍离子
- （12）柱子即可再次使用
- （13）如需长期保存，再生后加入 1 倍柱体积的 20%乙醇，封住上下端口，在 4℃ 保存。下次使用前需重新执行挂镍步骤。

快速再生法

- （1）适用于常规清洁（无镍离子去除）
- （2）每次纯化完成后，建议执行以下快速清洗：
- （3）用 0.5 M 咪唑缓冲液 洗涤 5 个柱体积
- （4）用 去离子水 洗涤 5 个柱体积
- （5）用 1-2 M NaCl 溶液 洗涤 5 个柱体积
- （6）用 去离子水 洗涤 5 个柱体积

常见问题与解决方案

问题	可能原因	解决方案
柱子反压过高	样品未完全澄清或有微粒	再次离心或过滤样品

	样品或缓冲液太粘稠	加入 DNase I 降解核酸；适当降低流速
洗脱液中无目的蛋白	蛋白可能在包涵体中	检查沉淀。若是包涵体，需在变性条件下纯化。
	蛋白表达量太低	优化蛋白表达条件
	蛋白被还原剂破坏	检查缓冲液中是否含有 DTT 等还原剂，并去除或更换缓冲液
	结合/洗脱条件不合适	优化咪唑浓度或 pH
洗脱产物不纯	洗涤不充分	增加洗涤缓冲液的体积或适当提高咪唑浓度
柱子颜色异常（变褐）	缓冲液中含有还原剂	将样品透析以去除还原剂，或更换耐受性更强的填料
蛋白在上样时沉淀	操作温度过低或蛋白聚	在室温下进行上样；在样品和缓冲液中加入 0.1% Triton X-100 或 Tween-20 等稳定剂