

Ni-NTA 琼脂糖纯化树脂

货号: Cat.No: P5103 Size: 5ml Resin (Total 10ml); Cat.No: P5104 Size: 25ml Resin (Total 50ml)

产品介绍

新赛美 Ni-NTA 琼脂糖凝胶 (Ni-NTA Agarose) 是一种预装了镍离子 (Ni<sup>2+</sup>) 的亲和层析纯化介质。其基质为 6% 的高度交联琼脂糖凝胶, 通过化学方法偶联了四齿螯合剂**次氨基三乙酸 (NTA)** 作为配体。该配体能高效螯合 Ni<sup>2+</sup> 离子, 形成非常稳定的八面体结构, 可与 6×His 标签蛋白发生特性结合, 从而实现目标蛋白的高效分离与纯化, NTA 配体含有四个螯合区, 相比传统的三齿螯合剂 (如 IDA), 能与 Ni<sup>2+</sup> 结合得更牢固, 有效防止纯化过程中金属离子的脱落。

技术参数

|        |                                 |
|--------|---------------------------------|
| 技术指标   | 详细参数                            |
| 基质     | 高度交联的 6% 琼脂糖凝胶 (6FF)            |
| 配基     | 次氨基三乙酸 (NTA)                    |
| 粒径范围   | 45-165 μm                       |
| 平均粒径   | 90 μm                           |
| 动态结合载量 | >30 mg 6×His 标签蛋白 (25KD) /mL 基质 |
| 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                    |

各试剂与 Ni-NTA 纯化树脂兼容性

| 试剂类别 | 代表性试剂                                | 兼容浓度    | 效果/影响              |
|------|--------------------------------------|---------|--------------------|
| 缓冲液  | Tris, HEPES, MOPS                    | ≤100 mM | 含仲胺或叔胺的缓冲液会缓慢还原镍离子 |
|      | 磷酸钠缓冲液                               | 常用浓度    | 兼容性好               |
| 还原剂  | β-巯基乙醇                               | ≤20 mM  | 防止二硫键交联            |
|      | DTT / DTE                            | ≤1 mM   | 低浓度会还原镍离子          |
|      | TCEP                                 | ≤5 mM   | 兼容性好               |
|      | 还原型谷胱甘肽                              | ≤10 mM  | 兼容性好               |
| 螯合剂  | EDTA / EGTA                          | ≤1 mM   | 螯合镍离子, 导致镍脱落       |
|      | 柠檬酸盐                                 | ≤60 mM  | 轻度螯合作用             |
| 去垢剂  | 非离子型 (Triton X-100, Tween 20, NP-40) | ≤2%     | 去除背景蛋白和核酸          |
|      | 阳离子型                                 | ≤1%     | 可兼容                |
|      | CHAPS                                | ≤1%     | 可兼容                |
|      | 阴离子型 (SDS, Sarkosyl)                 | ≤0.3%   | 不推荐, 高浓度影响结合       |
| 变性剂  | 尿素                                   | ≤8 M    | 溶解蛋白, 兼容           |

|     |                   |                         |                      |
|-----|-------------------|-------------------------|----------------------|
|     | 盐酸胍               | $\leq 6M$               | 溶解蛋白，兼容              |
| 氨基酸 | 组氨酸               | 低浓度 $\leq 20\text{ mM}$ | 与 Ni-NTA 结合，抑制非特异性结合 |
|     | 甘氨酸/谷氨酰胺/精氨酸      | —                       | 不推荐                  |
| 盐类  | NaCl              | 0.3–2 M                 | 抑制离子相互作用             |
|     | MgCl <sub>2</sub> | $\leq 4\text{ M}$       | 兼容性好                 |
|     | CaCl <sub>2</sub> | $\leq 5\text{ mM}$      | 兼容性好                 |

## 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 或 0.45  $\mu\text{m}$  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 <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.5 M NaCl, 10 mM 咪唑 | 8.0         |
| 漂洗缓冲液 | 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.5 M NaCl, 20 mM 咪唑 | 8.0         |
| 洗脱缓冲液 | 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 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

### 样品准备

可溶性蛋白样品：细胞裂解后离心（12,000 rpm，4℃，20~30 分钟），上清用 0.22 或 0.45  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{g/ml}$ ）和 Mg<sup>2+</sup>（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℃ 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  $\mu\text{m}$ （或 0.22  $\mu\text{m}$ ）的滤膜过滤

### 以下是使用预装柱进行纯化的步骤。

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<sup>2+</sup> 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

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

### 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
- (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  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (或 100 mM  $\text{NiCl}_2$ ) 洗涤
- (11) 用 10 倍柱体积的平衡缓冲液, 洗去游离镍离子, 柱子即可再次使用
- (12) 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  $4^\circ\text{C}$  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 |