Ni NTA Beads 6FF

Cat# PX0002

Storage at 4°C - 30°C

1.產品介紹

Ni NTA Beads 6FF 以高度交聯 6%瓊脂糖凝膠為基質，可以耐受較苛刻試劑條件外，其耐壓的基質，也可耐受最高 0.3 MPa 的壓力，該產品更適合用於工業大規模蛋白純化，可在相對較高流速下，對目的蛋白純化。

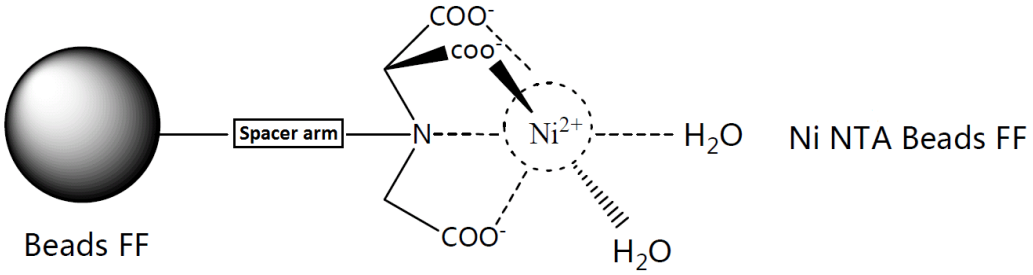

Table 1. Ni NTA Beads 6FF產品性能	
基質	高度交聯的6%瓊脂糖微球
載量 (/mL 基質)	>40mg 6XHis-tagged protein
粒徑 (μm)	45-165
最大壓力	0.3 MPa, 3 bar
儲存緩衝液	含20%乙醇 1XPBS
儲存溫度	4°C - 30°C

Table 2. Ni NTA Beads 6FF 試劑耐受情況	
試劑種類	濃度
還原劑	5 mM DTE / 1 mM DTT / 20 mM β-mercaptoethanol / 5 mM TCEP / 10 mM reduced glutathione
變性劑	8 M urea / 6 M Gua-HCl
去污劑	2% Triton ™ X-100 (nonionic) / 2% Tween ™ 20 (nonionic) / 2% NP-40 (nonionic) / 2% Cholate (anionic) / 1% CHAPS (zwitterionic)
其他類	500 mM imidazole / 20% ethanol / 50% glycerol / 100 mM Na_2SO_4 / 1.5 M NaCl 1 mM EDTA / 60 mM citrate
緩衝液	50 mM sodium phosphate, pH 7.4 / 100 mM Tris-HCl, pH 7.4 / 100 mM Tris-acetate, pH 7.4 / 100 mM HEPES, pH 7.4 / 100 mM MOPS, pH 7.4 / 100 mM sodium acetate, pH 4

2.純化流程

2.1 緩衝液準備

可使用下列推薦緩衝液，也可根據使用習慣配置不同的緩衝液體系，基本原理為低咪唑上樣，高咪唑沖提，或高 pH 上樣，低 pH 沖提。所用水和 Buffer 在使用之前建議用 0.22μm 或 0.45μm 濾膜過濾。Ni NTA Beads FF 可用於可溶蛋白和包涵體蛋白純化，兩種方法所需緩衝液不同，具體配置方法請見下表。

Table 3. 可溶性組氨酸標籤蛋白純化緩衝液配方

名稱	體積	配方
Lysis Buffer	1L	50mM NaH_2PO_4（7.80g NaH_2PO_4•2H2O） 300mM NaCl（17.54 gNaCl） 10mM imidazole（0.68g imidazole） 使用 NaOH 溶液調整 pH 值至 8.0。
Wash Buffer	1L	50mM NaH_2PO_4（7.80g NaH_2PO_4•2H2O） 300mM NaCl（17.54g NaCl） 20mM imidazole（1.36g imidazole） 使用 NaOH 溶液調整 pH 值至 8.0。
Elution Buffer	1L	50mM NaH_2PO_4（7.80g NaH_2PO_4•2H2O） 300mM NaCl（17.54g NaCl） 250mM imidazole（17.0g imidazole） 使用 NaOH 溶液調整 pH 值至 8.0。

Table 4. 包涵體組氨酸標籤蛋白純化緩衝液配方

名稱	體積	配方
Lysis Buffer	1L	8M Urea（480.50g urea） 100 mM NaH_2PO_4（15.60g NaH_2PO_4•2H2O） 100 mM Tris•HCl（15.76g Tris•HCl） 使用 HCl 溶液調整 pH 值至 8.0。
Wash Buffer	1L	8M Urea（480.50g urea） 100 mM NaH_2PO_4（15.60g NaH_2PO_4•2H2O） 100 mM Tris•HCl（15.76g Tris•HCl） 使用 HCl 溶液調整 pH 值至 6.3。
Elution Buffer	1L	8M Urea（480.50g urea） 100 mM NaH_2PO_4（15.60g NaH_2PO_4•2H2O） 100 mM Tris•HCl（15.76g Tris•HCl） 使用 HCl 溶液調整 pH 值至 4.5。

2.2 樣品準備

2.2.1 細菌或酵母菌表達蛋白

1) 挑取單菌落至培養基中，根據載體使用說明加入相應濃度的誘導劑誘導相應的時間。

2) 表達結束後，將培養液轉移到離心杯中，以 7000rpm 離心 15min 收集菌體，加入 1/10 體積 Lysis Buffer 和 PMSF，PMSF 在破碎前加入，使最終濃度為 1mM。加入溶菌酶（工作濃度為 0.2-0.4mg/ml，如表達宿主細胞內含 pLysS 或 pLysE，則可不加溶菌酶，也可加入其他蛋白酶抑制劑，但不能影響目的蛋白與樹脂的結合）。

3) 將菌體沉澱懸浮，（若菌液濃度高，也可加入 10μg/ml RNase A 和 5μg/ml DNase I），混勻，置於冰上，於冰上超聲破碎細胞至菌液保持澄清。

4) 將澄清破碎液移至離心管中，以 10000rpm，4 度離心 20-30 分鐘。取上清液，置於冰上備用或-20 度保存。

2.2.2 酵母、昆蟲和哺乳細胞分泌表達可溶性蛋白

1) 將細胞培養液移至離心杯，以 5000rpm 離心 10min，收集菌體上清液，如上清液中不含 EDTA、組氨酸和還原劑等物質，可直接加入管柱使用；如含 EDTA、組氨酸和還原劑等物質，需用 1×PBS 4℃下透析後加入柱子。

2) 對於大量體積的上清液，需加入硫酸氨沉澱濃縮後，蛋白再用 1XPBS 4℃透析後才加入柱子。

2.2.3 包涵體蛋白純化(變性條件)

1) 將培養液移至離心杯中，以 7000rpm 離心 15min 後收集菌體，去上清液。

2) 按菌體:Lysis buffer=1:10(W/V) 將菌體懸浮，混勻，冰浴超聲破碎。

3) 將破碎液移至離心管，以 10,000rpm，4 度離心 20-30 分鐘。去上清液，步驟 2）和 3）可再重複一次。

4) 按照菌體:Lysis buffer (含 8M 尿素)=1:10(W/V) 將包涵體懸浮起。

5) 變性條件下進行 His 標籤蛋白純化，緩衝液配方請見表 4。

2.3 Ni NTA Beads 6FF 裝填

Ni NTA Beads 6FF 廣泛應用於工業純化，以下介紹 Ni NTA Beads 6FF 填裝層析柱方法。

層析柱的裝填（使用儲液器裝填）

1) 以去離子水沖洗層析柱底篩板與接頭，確保柱底篩板上無氣泡，關閉柱底出口，並在柱底部留 1-2cm 去離子水。

2) 將樹脂懸浮起來，將漿液連續地倒入層析柱中。用玻璃棒沿柱壁倒入漿液可減少氣泡的產生。

3) 若使用儲液器，應立即在層析柱和儲液器中加滿水，將進樣分配器放置於漿液表面，連接至泵上，避免在分配器或進樣管中產生氣泡。

4) 打開層析柱底部出口，開起泵，使其在設定的流速下進行。最初應讓緩衝液緩慢流過層析柱，然後緩慢增加至最終流速，可避免液壓對形成柱床產生衝擊，也可避免柱床形成不均勻。（注意：在隨後的色譜程式中，不要超過最大裝柱流速的 75%）當柱床高度穩定後，在最後裝柱流速下再上 3 倍柱床體積以上的去離子水。標記柱床高度。

5) 關閉泵，關閉層析柱出口。

6) 如果使用儲液器，去除儲液器，將分配器置於層析柱中。

7) 將分配器推向柱子至標記的柱床高度處。允許裝柱液進入分配器，鎖緊分配器接頭。

8) 將裝填好的層析柱連接至泵或色譜系統中，開始平衡。如果需要可以重新調整分配器。

2.4　樣品純化

將 Ni NTA Beads 6FF 裝填好後，可使用各種常規的中低壓色譜系統。

1) 將泵管道中注滿去離子水。去掉上塞子，將層析柱連接至色譜系統中，打開下出口，將預裝柱接到色譜系統中旋緊。

2) 使用 3-5 倍柱體積去離子水沖洗出儲存緩衝液。

3) 使用至少 5 倍柱床體積 Lysis Buffer 平衡色譜柱。

4) 利用泵或注射器上樣。

5) 使用 Wash Buffer 沖洗柱子，直到紫外吸收達到穩定基線（一般至少 10-15 個柱體積）。

注：在樣品和結合緩衝液中加入咪唑可以提高樣品純度。

6) 使用 Elution Buffer 採用一步法或線性梯度沖提。一步沖提中，通常 5 倍柱體積洗脫液即足夠。也可以使用小的梯度，如 20 倍柱體積或更多，來分離不同結合強度的蛋白質。

2.5　SDS-PAGE 檢測

將使用純化產品得到的樣品(包括流出組分、洗雜組分和沖提組分)以及原始樣品使用 SDS-PAGE 檢測純化效果。

3.在位清洗

當填料使用過程中發現反壓過高或填料上出現明顯污染時，需要進行在位清洗操作（Cleaning-in-Place，CIP）。建議按照以下操作去除填料殘留污染物，如沉澱蛋白、疏水蛋白和脂蛋白等。

去除強疏水結合的蛋白，脂蛋白和脂類

透過使用 30%異丙醇清洗 5-10 個柱體積，接觸時間為 15-20 分鐘可以去除此類污染物。再使用 10 倍柱體積去離子水清洗。也可選擇含有去汙劑的酸性或鹼性溶液，清洗填料 2 倍柱體積。如含有 0.1–0.5%非離子去汙劑的 0.1 M 醋酸溶液，接觸時間為 1–2 小時。去汙劑處理後，需使用 70%的乙醇清洗 5 個柱體積，以徹底去除去汙劑。最後使用 10 倍柱體積的去離子水清洗。

去除離子作用結合的蛋白

使用 1.5M NaCl 溶液接觸時間為 10-15 分鐘清洗。再使用去離子水清洗 10 個柱體積。

4.填料再生

組氨酸標籤蛋白親和純化填料所帶的鎳離子不需要經常螯合去除和重新掛鎳離子。當填料使用過程中發現顏色變淺，或者填料載量明顯變低時，需對填料進行鎳離子剝離和重新掛鎳離子，稱為填料再生。將填料裝填在合適的層析柱內，按下面操作流程進行鎳離子剝離和重新掛鎳離子。

1) 使用 0.2 M 醋酸溶液（含 6M GuHCl）清洗 2 倍柱體積

2) 使用去離子水清洗 5 倍柱體積

3) 使用 2% SDS 清洗 3 倍柱體積

4) 使用去離子水清洗 5 倍柱體積

5) 使用乙醇清洗 5 倍柱體積

6) 使用去離子水清洗 5 倍柱體積

7) 使用 100 mM EDTA (pH 8.0) 清洗 5 倍柱體積

8) 使用去離子水清洗 5 倍柱體積

9) 使用 100 mM $NiSO_4$ 清洗 5 倍柱體積

10) 使用去離子水清洗 10 倍柱體積

填料再生後，可以立即使用，也可保存於 20%的乙醇中，置於 4°C 保存。

5.問題與解決方案

問題	原因分析	解決方案
柱子反壓過高	填料堵塞	裂解液中含有微小的固體顆粒，建議上柱前使用 0.22 或 0.45μm 濾膜過濾，或離心去除。
	樣品太黏稠	樣品中含有高濃度的核酸，加長破碎時間至粘度降低，或添加 DNase I（終濃度 5 μg/ml），Mg^{2+}（終濃度 1mM），置於冰上 10-15 分鐘。
沖提組分中沒有目的蛋白	蛋白可能是包涵體，沒有在上清中	可以通過電泳檢測裂解液分析上清中是否含有目的蛋白，包涵體蛋白需要按照包涵體蛋白的純化方式。
	表達量太低	優化表達條件。
	目的蛋白結合比較弱，在洗雜步驟被洗下來了	提高 wash Buffer 的 pH，或者降低咪唑濃度。
	目的蛋白結合過強，不容易沖提下來	降低 Elution Buffer 的 pH 值，或者增加 Elution Buffer 中咪唑濃度。
	蛋白降解	菌體破碎時添加蛋白酶抑制劑。在 4°C 下進行純化操作。
沖提組分不純（含有多種蛋白）	洗雜不徹底	增加 Wash Buffer 體積。
	樣品中含有其他的組氨酸標籤蛋白	透過調整 pH 值，或者咪唑濃度來優化洗雜條件。再使用其他的純化手段（如離子交換，疏水等）進一步純化沖提組分。
填料呈現褐色	緩衝液中含有 DTT 等還原劑	請參考表 2，適當降低還原劑 DTT 濃度，或改用巰基乙醇。
上樣過程中蛋白發生沉澱	操作溫度太低	室溫下進行上樣。
	蛋白發生聚集	在樣品和緩衝液中添加穩定劑，如 0.1%的 Triton X-100 或 Tween-20。