

His-tag Ni-NTA Agarose Resin {His标签蛋白琼脂糖纯化凝胶}

货号：BR00071

规格：5 mL/20 mL/50 mL/100 mL

◆ 产品简介

Ni-NTA Agarose 是利用 Ni^{2+} 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^{2+} 具有相互作用的生物分子的分离纯化。

◆ 介质性能参数

介质	高度交联 6%的琼脂糖
粒径范围	45-165 μm
平均粒径 D50	90 $\pm$ 5 μm
结合载量	≥ 40 mg (His 标签蛋白) /mL (介质)
金属离子载量	16-23 μmol (Ni^{2+}) /mL (介质)
pH 稳定性*	3-12 (长期) 2-14 (短期)
化学稳定性	所有常用水溶液和缓冲液避免使用螯合剂（例如 EDTA、EGTA）和还原剂（例如 DTT 和 DTE）
线性流速(0.3 MPa)	≥ 300 cm/h
操作压力	≤ 0.3 MPa
保存液	20%乙醇
贮存条件	4°C-8°C

*此处稳定性指的是在未螯合金属离子时介质的稳定性

◆ 产品特点

1. 快速、简单（一步纯化）；
2. 使用范围广、操作简单，适合重力柱和预装柱（蠕动泵或者层析系统）；
3. 多重选择，可以螯合各种金属离子进行使用（例如 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ca^{2+} 等）；
4. 相对于 Ni-NTA Agarose 来说， Ni^{2+} 脱落低、试剂兼容性广；
5. 备注:当螯合 Ca^{2+} 时，避免使用磷酸盐缓冲液（会形成沉淀）。

◆ 常用试剂兼容性

缓冲液	0.05 M sodium phosphate, pH7.4 0.1 M Tris-HCL, pH7.4 0.1 M Tris-acetate, pH7.4
-----	--

	0.1 M HEPES, pH7.4 0.1 M MOPS, pH7.4 0.1 M sodium acetate, pH4
变性剂	8 M Urea 6 M Gua-HCl
去污剂	2% Triton X-100 2% Tween 20 2% NP-40 2% Cholate 1% CHAPS
还原剂	0.005 M DTE 0.005 M DTT 0.02 M β -mercaptoethanol 0.005 M TCEP 0.01 M reduced glutathione
其他添加剂	0.5 M Imidazole 20% Ethanol 50% Glycerol 0.1M Na_2SO_4 1.5 M NaCl 0.001 M EDTA 0.06 M Citrate

◆ 溶液制备

1. 平衡液：0.02 M PB、0.5 M NaCl、0.02-0.04 M Imidazole, pH 7.4

2. 洗脱液：0.02 M PB、0.5 M NaCl、0.5 M Imidazole, pH 7.4

备注：当纯化包涵体时，溶液中添加 8 M Urea 或 6 M Gua-HCl。

◆ 样品制备

1. 样品所在溶液要和平衡液保持一致，可用平衡液进行裂解、透析/超滤/G25 进行缓冲液置换。

2. 样品过滤（平均粒径 < 45 μm ，用 0.22 μm 过滤；45 μm < 平均粒径 < 165 μm ，用 0.45 μm 过滤；平均粒径 > 165 μm ，用 0.8 μm 过滤）。

◆ 纯化流程

1. 采用液滴对液滴（避免引入气泡）的方式将柱子连接到层析系统上。

2. 用纯化水以 5 mL/min 的流速冲洗 5 个 CV。

3. 用洗脱液以 5 mL/min 的流速冲洗 5 个 CV。

4. 用平衡液以 5 mL/min 的流速冲洗 10 个 CV。

5. 将样品以 5 mL/min 的流速上样。
6. 用平衡液以 5 mL/min 的流速冲洗至紫外吸收值平稳（10-15 个 CV）。
7. 用洗脱液以 5 mL/min 的流速洗脱 5 CV 或 20 CV（阶梯式洗脱 5 CV/线性梯度洗脱 20 CV）。

◆ 脱 Ni^{2+}

1. 用蒸馏水清洗层析柱至少 2 CV，流速为 60 cm/h。
2. 用 0.1 M EDTA 清洗至少 4 CV，流速为 60 cm/h。

◆ 普通污染物的去除

1. 用蒸馏水清洗至少 4 CV，流速为 60 cm/h。
2. 用 0.5 M NaOH 清洗至少 4 CV，流速为 60 cm/h。
3. 用 1.5 M NaCl 清洗至少 2 CV，流速为 60 cm/h。
4. 用蒸馏水清洗至少 4 CV，流速为 60 cm/h，直到 UV280 基线，洗脱 pH 及电导稳定。
5. 备注：如果污染比较严重，当使用 1 M NaOH 清洗时，可使用较低流速以增加接触时间。在使用 0.5 M NaOH 清洗之前，务必保证此时层析介质内 Ni^{2+} 已去除完毕。

◆ 脂类、疏水结合蛋白或脂蛋白的去除

1. 用 70%乙醇或 30%异丙醇清洗 4 CV，如色素沉积较明显，必要时可加入 1% Triton X-100（体积比），流速为 30 cm/h。
2. 用蒸馏水清洗至少 4CV，流速为 60 cm/h，直到 UV280 基线，洗脱 pH 及电导稳定。

◆ 挂 Ni^{2+}

1. 用 0.2 M NiSO_4 清洗至少 3CV，流速为 30 cm/h。
2. 用蒸馏水清洗至少 3CV，流速为 60 cm/h。
3. 用 50 mM PB，pH7.4 缓冲液清洗至少 4CV，流速为 60 cm/h。
4. 用蒸馏水清洗至少 2CV，流速为 60 cm/h，直到流出液不再有颜色流出。
5. 用洗脱液清洗至少 2CV，流速为 60 cm/h，观察流出液是否有颜色。

◆ 保存

未使用的层析介质以及长期不使用的层析介质保存在 20%的乙醇中，4°C-8°C。

◆ 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	上样量过载	降低上样量
	上样流速过快	降低上样流速

	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
	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
	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
	目标蛋白出现在流穿中	目标蛋白没有成功表达或样品与平衡液中 pH 及组分不正确
洗脱时没有收集到目标物或只收集到少量目标物	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
	洗脱条件不合适	加大洗脱液中咪唑浓度
	洗脱时间不够	降低流速, 延长洗脱液的保留时间
	洗脱体积过小	加大洗脱体积
	洗杂时, 目的蛋白被洗下来	降低洗杂液中的咪唑浓度
	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% Tween 20
目标物纯度较低	样品没有经过前处理	样品上柱前必须要经过离心或过滤
	样品粘度过高	用平衡液适当的稀释样品, 降低粘度
	洗杂不彻底	加大洗杂体积直至基线平稳并与平衡液一致
	杂质蛋白或脂类在介质中聚集沉淀	及时有效地清洗介质
	杂质与 Ni^{2+} 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)
	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
	柱料装填效果不佳	重新装填或购买
	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% Triton X-100、1.0% Tween 20 或 50% 甘油
	分离柱顶部有较大储样体积	重新装柱或降低储样体积
	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	上样流速过快	降低上样流速
	蛋白或脂类在介质中聚集, 导致载量下降	及时清洗介质
	使用次数过多	更换新介质
	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
色谱峰上升过陡	介质装填过紧	重新装柱
色谱峰上升过缓或拖尾	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	蛋白或脂类聚集	及时清洗介质或滤膜
	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
	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