

Ni 层析介质 (IDA)

Ni IDA Beads

货号	规格
BDTL0010-5	5ml
BDTL0010-25	25ml
BDTL0010-250	250ml

1. 产品介绍

Ni 层析介质 (IDA) 可用于各种表达来源 (如大肠杆菌、酵母、昆虫细胞和哺乳动物细胞) 的组氨酸标签 (6×His) 蛋白的纯化。它是以 4% 琼脂糖凝胶为基质, 通过化学方法偶联了三配位的亚氨基二乙酸 (IDA), 螯合镍离子 (Ni^{2+}) 后, 可以形成比较稳定的平面四边形结构, 从而有更多的位点与组氨酸标签上的咪唑环继续配位, 达到结合目的蛋白的效果 (产品化学结构见图 1 所示)。但是, 这样的结构比较容易受到其他小分子的进攻, 镍离子易被还原或者被螯合, 从而破坏其化学结构, 无法结合目的蛋白。

Ni 层析介质 (IDA) 具有载量高, 性价比高的优点。具体性能见表 1。

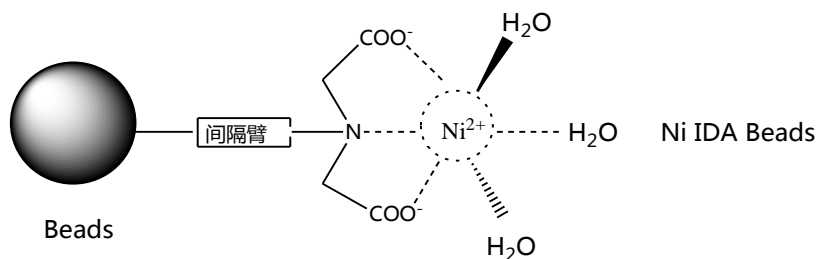


图 1. Ni 层析介质 (IDA) 化学结构示意图

表 1. Ni 层析介质 (IDA) 性能表

项目	性能
基质	4% 琼脂糖凝胶
载量 (/ml 基质)	>50mg 6×His-tagged protein
微球粒径 (μm)	45–165
最大压力	0.1 MPa, 1 bar
pH 稳定范围	短时间 (至少 2h) 4-9; 长时间 (一周内) 4-9
储存缓冲液	20% 乙醇
工作温度	4-30°C

2. 纯化流程

2.1 Buffer 的准备

可使用下列推荐 Buffer，也可根据自己的使用习惯配置不同的缓冲液体系，基本原理就是低咪唑上样，高咪唑洗脱。Buffer 在使用前最好用 0.22 μm 或者 0.45 μm 滤膜过滤除菌。具体配置方法见表 2。

表 2. 可溶性组氨酸标签蛋白纯化所需缓冲液及配方

名称	体积	配方
Lysis Buffer	1L	50 mM NaH ₂ PO ₄ (6.90 g NaH ₂ PO ₄ H ₂ O) 300 mM NaCl (17.54 g NaCl) 10 mM imidazole (0.68 g imidazole) 使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0 使用 0.22 或者 0.45 μm 滤膜过滤除菌。
Wash Buffer	1L	50 mM NaH ₂ PO ₄ (6.90 g NaH ₂ PO ₄ H ₂ O) 300 mM NaCl (17.54 g NaCl) 20 mM imidazole (1.36 g imidazole) 使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0 使用 0.22 或者 0.45 μm 滤膜过滤除菌。
Elution Buffer	1L	50 mM NaH ₂ PO ₄ (6.90 g NaH ₂ PO ₄ H ₂ O) 300 mM NaCl (17.54 g NaCl) 250 mM imidazole (17.0 g imidazole) 使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0 使用 0.22 或者 0.45 μm 滤膜过滤除菌。

2.2 样品准备

2.2.1 细菌或酵母表达可溶性蛋白

1. 挑取单菌落到 LB 培养基中，根据载体使用说明，加入相应浓度的诱导剂诱导相应的时间。
2. 表达结束后，将培养液转移到离心杯中，7,000rpm 离心 15min，收集菌体，然后加入 1/10 体积的 Lysis

Buffer 和 PMSF, PMSF 在破碎前加入, 最终浓度为 1mM。加入溶菌酶 (工作浓度为 0.2-0.4mg/ml, 如果表达的宿主细胞内含 pLysS 或 pLysE, 可以不加溶菌酶), (同时也可加入其他蛋白酶抑制剂, 但不能影响目的蛋白与层析介质的结合)。

3. 将菌体沉淀悬浮起来, (如果菌液浓度高, 也可考虑加入 10 μ g/ml RNase A 和 5 μ g/ml DNase I), 混匀, 放置于冰上, 然后冰上超声破碎细胞, 至菌液基本保持澄清。
4. 将澄清的破碎液转移至离心管中, 15,000rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 20-30 分钟。取上清, 置于冰上备用或 -20 $^{\circ}$ C 保存。

2.2.2 酵母、昆虫和哺乳细胞分泌表达可溶性蛋白

1. 将细胞培养液转移至离心杯, 5,000rpm 离心 10min, 收集菌体得上清, 如上清中不含 EDTA、组氨酸和还原剂等物质, 即可直接加入柱子使用; 如含有 EDTA、组氨酸和还原剂等物质, 需用 1 \times PBS 4 $^{\circ}$ C 透析才能加入柱子。
2. 对于大量体积的上清, 需加入硫酸氨沉淀浓缩后, 蛋白还需用 1 \times PBS 4 $^{\circ}$ C 透析后才能加入柱子。

2.3 样品纯化

1. 将本层析介质装入合适的层析柱, 用 5 倍柱体积的 Lysis Buffer 进行平衡, 使层析介质处于与目的蛋白相同的缓冲体系下, 起到保护蛋白的作用。
2. 将样品加到平衡好的层析介质中, 流速控制在 0.5ml/分钟左右 (保证目的蛋白与 Ni²⁺充分接触, 提高目的蛋白的回收率), 收集流出液。
3. 用 10-15 倍柱体积的 Wash Buffer 进行清洗, 流速控制在 1-1.5ml/分钟, 去除非特异性吸附的杂蛋白, 收集洗杂液。
4. 使用 5-10 倍柱体积的 Elution Buffer, 收集洗脱液, 即目的蛋白组分。
5. 依次使用 3 倍柱体积的 Lysis Buffer 和 5 倍柱体积的去离子水平衡层析介质, 最后再用 5 倍柱体积的 20% 的乙醇平衡, 然后保存在等体积的 20% 的乙醇中, 置于 4 $^{\circ}$ C 保存, 防止层析介质被细菌污染。

2.4 SDS-PAGE 检测

将使用纯化产品得到的样品 (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。

3. 在位清洗

当层析介质使用过程中发现反压过高 (大于 0.5Mpa) 或者层析介质上面出现明显的污染时, 需要进行在位清洗操作 (Cleaning-in-Place, CIP)。在位清洗前, 先把 Ni²⁺脱掉 (参见 4.层析介质再生), 清洗结束后, 将层析介质保存在 20%乙醇中, 后者重新挂镍再保存在 20%乙醇中。

建议按照下面操作去除层析介质上残留的污染物, 如沉淀蛋白、疏水蛋白和脂蛋白等。

➤ 去除强疏水结合的蛋白, 脂蛋白和脂类

通过使用 30%异丙醇清洗 5-10 个柱体积, 接触时间为 15-20 分钟可以去除此类污染物。然后, 再使用 10 倍柱体积的去离子水清洗。也可以选择使用含有去污剂的酸性或碱性溶液, 清洗层析介质 2 倍柱体积。例如,

含有 0.1–0.5% 非离子去污剂的 0.1 M 醋酸溶液，接触时间为 1–2 小时。去污剂处理后，需要使用 70% 的乙醇清洗 5 个柱体积，以彻底去除去污剂。最后使用 10 倍柱体积的去离子水清洗。

➤ 去除离子作用结合的蛋白

使用 1.5M NaCl 溶液接触时间为 10-15 分钟清洗。然后，再使用去离子水清洗 10 个柱体积。

4. 层析介质再生

组氨酸标签蛋白亲和纯化层析介质所带的镍离子不需要经常螯合去除和重新挂镍离子。当层析介质使用过程中发现反压过高（大于 0.5MPa），层析介质上面出现明显的污染，或者层析介质载量明显变低时，需要进行对层析介质进行镍离子剥离和重新挂镍离子，也就是层析介质再生。将层析介质装填在合适的层析柱内，按照下面操作流程进行镍离子剥离和重新挂镍离子。

1. 使用 0.2 M 醋酸溶液（含 6 M GuHCl）清洗 2 倍柱体积；
2. 使用去离子水清洗 5 倍柱体积；
3. 使用 2% SDS 清洗 3 倍柱体积；
4. 使用去离子水清洗 5 倍柱体积；
5. 使用乙醇清洗 5 倍柱体积；
6. 使用去离子水清洗 5 倍柱体积；
7. 使用 100 mM EDTA (pH 8.0)清洗 5 倍柱体积；
8. 使用去离子水清洗 5 倍柱体积；
9. 使用 100 mM NiSO₄ 清洗 5 倍柱体积；
10. 使用去离子水清洗 10 倍柱体积；

再生的层析介质，可以立即使用，如不立即使用，需要将层析介质悬浮于等体积的 20%乙醇中，置于 4 ℃ 保存。

5. 问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
柱子反压过高	层析介质被堵塞	按照第3部分对层析介质进行在位清洗。 裂解液中含有微小的固体颗粒，建议上柱前使用滤膜（0.22 或 0.45 μm）过滤，或者离心去除。
	样品太粘稠	样品中含有高浓度的核酸，加长破碎时间直至粘度降低，或者添加 DNase I（终浓度 5 μg/ml），Mg ²⁺ （终浓度 1 mM），冰上孵育 10-15 分钟。
	缓冲液太粘稠	有机溶剂或者蛋白稳定试剂（如甘油等）可能会引起反压增高，降低操作流速。

洗脱组分中没有目的蛋白	蛋白可能是包涵体，没有在上清中	可以通过电泳检测裂解液分析上清中是否含有目的蛋白，包涵体蛋白需要按照包涵体蛋白的纯化方式。
	表达量太低	优化表达条件。
	目的蛋白结合比较弱，在洗杂步骤被洗下来了	提高 wash Buffer 的 pH，或者降低咪唑浓度。
	目的蛋白结合过强，不容易洗脱下来	降低 Elution Buffer 的 pH 值，或者增加 Elution Buffer 中咪唑浓度。 使用10-100mM EDTA溶液剥离镍离子，同时得到目的蛋白。
	蛋白降解	在 4 °C 下进行纯化操作。 菌体破碎时添加一些蛋白酶抑制剂。
洗脱组分不纯（含有多种蛋白）	洗杂操作不彻底	增加 Wash Buffer 体积。
	样品中含有其他的组氨酸标签蛋白	通过调节 pH 值，或者咪唑浓度来优化洗杂条件。 再使用其他的纯化手段（如离子交换，疏水等）进一步纯化洗脱组分。
层析介质颜色变浅或变成白色	镍离子脱落或被剥离	按照第 4 部分层析介质再生中的建议重新挂镍离子。
层析介质呈现褐色	缓冲液中含有 DTT	对 Ni IDA Beads，不能耐受 DTT，建议换用 Ni NTA Beads 或者 Ni NTA Beads FF。 对于 Ni NTA Beads 或者 Ni NTA Beads FF，建议降低 DTT 的浓度至 2mM 以下，或者改用巯基乙醇。
上样过程中蛋白发生沉淀	操作温度太低	室温下进行上样。
	蛋白发生聚集	在样品和所有的缓冲液中添加稳定剂，如 0.1% 的 Triton X-100 或者 Tween-20。

6. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
Ni 层析介质 (IDA)	BDTL0010-5	5ml
	BDTL0010-25	25ml
	BDTL0010-250	250ml
Ni 层析介质 (NTA)	BDTL0011-5	5ml
	BDTL0011-10	10ml
	BDTL0011-50	50ml
	BDTL0011-100	100ml
Ni 层析介质 (NTA) 重力预装柱套装	BDTL0011-K	套
Ni NTA 高速层析介质 (6FF)	BDTL0012-10	10ml
	BDTL0012-50	50ml
	BDTL0012-100	100ml
Ni NTA 高速层析介质 (6FF) 预装柱	BDTL0012-11	1×1ml
	BDTL0012-51	5×1ml
	BDTL0012-15	1×5ml
	BDTL0012-55	5×5ml
	BDTL0012-3115	3×1ml+1×5ml