Ni-NTA Agarose
用户手册

克劳宁（北京）生物科技有限公司
北京市海淀区中关村西区天创科技大厦407A
邮编: 100080

电话: 0086-10-62698317
传真: 0086-10-62698352
电邮: mclab@mclab.com.cn
订购: order@mclab.com.cn
咨询: info@mclab.com.cn
网站: www.mclab.com.cn

目录

用户手册介绍 ---------- 1
细胞裂解 ---------- 1
昆虫细胞裂解 ---------- 1
哺乳动物细胞裂解 ---------- 1
蛋白纯化-非变性条件 ---------- 2
蛋白纯化-变性条件 ---------- 2
蛋白纯化-混合条件 ---------- 3
Ni-NTA树脂活化 ---------- 3
组成成分 ---------- 3
疑难解答 ---------- 4

2011年12月修订

Ni-NTA 纯化

MCLAB Ni-NTA agarose beads可用于从细菌、昆虫及哺乳动物细胞中纯化高质量的6x HIS-tagged 重组蛋白。由于Ni-NTA agarose beads对6x his-tagged residue的选择性和高亲和性，使其可广泛用于蛋白纯化。
可对感兴趣的蛋白在变性、非变性或混合条件下进行纯化。可在低pH条件下或使用竞争性结合分子比如咪唑洗脱Ni-NTA resin结合的蛋白。

非变性条件和变性条件：

如果你的目的蛋白在裂解上清液中可溶，且保持蛋白的活性对于后续试验很重要，需要使用非变性纯化。
相反，如果你的目的蛋白在裂解上清液中不可溶，且蛋白活性不重要，就可以使用变性纯化。
而如果你的目的蛋白在裂解上清液中不可溶，但保持蛋白的活性很重要，就需要使用混合裂解条件，即蛋白的裂解及过柱在变性条件下完成，在蛋白复性阶段用非变性缓冲液进行洗涤和洗脱。请注意，这只是一个大概的试验方案，并不适用于所有的蛋白。

细胞裂解

材料:

缓冲液的组份参见第3页
- 非变性裂解液binding buffer
- 超声波仪
- 10 μg/ml RNase 和 5 μg/ml Dnase I
- 离心机
- 灭菌的蒸馏水
- SDS-PAGE上样缓冲液
- Guanidinum裂解缓冲液
- Lysozyme菌体裂解液
- Bestatin和Leupeptin哺乳动物细胞裂解液

用户可根据自己试验的需要，适当扩大或缩小裂解液的体积。

菌体细胞裂解-非变性条件:

- 从50ml培养物中收获菌体细胞，5000rpm离心5min，用8ml Native Binding Buffer与离心管中将菌体重新悬起
- 加入8mg 溶菌酶，冰上孵育30分钟
- 用微型探头于冰上对菌体进行超声，超声10s，间歇10s，超声6次。
- 此步骤可选。如果裂解液超声后非常粘稠，加入RNase A（10 μg/ml）和nase I（5μg/ml），置冰上孵育10-15min
- 将裂解液以3000×g离心15分钟，以沉淀细胞碎片。上清转移到一个新的容器。
- 取5 μl用作SDS-PAGE分析，其余的上清液在冰上或-20℃保存备用。

菌体细胞裂解-变性条件:

- 将Guandinium裂解缓冲液置37℃，pH 7.8环境中平衡
- 从50ml培养物中收获菌体细胞，5000rpm离心5min，用8ml Guanidinium Binding Buffer与离心管中将菌体重新悬起
- 室温条件下，轻轻混匀菌体细胞，作用5~10分钟
- 用微型探头超声菌体，5秒每次，高强度超声3次
- 3000 x g离心15分钟，以沉淀裂解液中的细胞碎片，将上清转移至另一个新的容器内。
- 取5μl 用于SDS-PAGE分析，其他的上清液置冰上或-20℃保存备用。

注意：含Guanidinium Lysis Buffer的样品在进行SDS-PAGE电泳前，需经过稀释、透析或TCA沉淀，以防造成SDS沉淀。

昆虫裂解

以下方案是针对杆状病毒感染细胞系，但该方案是通用的，用户可根据特定的细胞系进行优化。
大规模蛋白表达应该在已知的蛋白最大表达时间点进行。一般来说，蛋白表达在接种细胞的1升烧瓶中进行，细胞密度为2×106个细胞/ ml，总体积为500ml。当MOI为10 pfu/细胞时，细胞感染病毒的滴度最高。在蛋白最高表达点，用50ml管离心收获细胞，并储存在-70℃备用。

昆虫细胞裂解-非变性条件:

- 制备8ml 含0.5μg/ml Leupeptin的Native Binding Buffer
- 将50ml培养物5000rpm离心5分钟，收获菌体细胞，加入8ml 含0.5μg/ml Leupeptin的Native Binding Buffer重新悬起细胞。
- 用液氮或干冰（乙醇）和42℃的水浴，将细胞反复冻融以裂解。
- 将裂解液通过18号针头，反复作用4次，以剪段DNA
- 3000 x g离心15分钟，以沉淀裂解液中的细胞碎片。将上清转移至新的容器内。
- 取5μl 裂解液用作SDS-PAGE分析，剩余裂解液置冰上或-20℃保存备用。

昆虫细胞裂解-变性条件:

- 将50ml培养物5000rpm离心5分钟，收获菌体细胞，加入8ml 含0.5μg/ml Leupeptin的Native Binding Buffer重新悬起细胞。
- 将裂解液通过18号针头，反复作用4次
- 3000 x g离心15分钟，以沉淀裂解液中的细胞碎片。将上清转移至新的容器内。
- 取5μl 裂解液用作SDS-PAGE分析，剩余裂解液置冰上或-20℃保存备用。

注意：含Guanidinium Lysis Buffer的样品在进行SDS-PAGE电泳前，需经过稀释、透析或TCA沉淀，以防造成SDS沉淀。

哺乳动物细胞裂解

以下哺乳动物细胞裂解方案具有通用性，用户可根据特定的细胞系自行优化。
特定重组蛋白的表达，需要5 x 106至1 x 107个细胞。在适宜

的培养基中接种并培养细胞至80%-90%密度。使用胰蛋白酶消化细胞，将细胞沉淀在液氮或-70℃保存备用。

哺乳动物细胞裂解-非变性条件:

- 用8ml 含蛋白酶抑制剂，如Bestatin和Leupeptin，的Native Binding Buffer重悬细胞沉淀
- 用液氮或干冰（乙醇）和42℃的水浴，将细胞反复冻融以裂解。
- 将裂解液通过18号针头，反复作用4次，以剪段DNA
- 3000 x g离心15分钟，以沉淀裂解液中的细胞碎片。将上清转移至新的容器内。
- 取5μl 裂解液用作SDS-PAGE分析，剩余裂解液置冰上或-20℃保存备用。

哺乳动物细胞裂解--变性条件:

- 用8ml Guanidinium Lysis Buffer重悬细胞沉淀
- 将裂解液通过18号针头，反复作用4次，以剪段DNA
- 3000 x g离心15分钟，以沉淀裂解液中的细胞碎片。将上清转移至新的容器内。
- 取5μl 裂解液用作SDS-PAGE分析，剩余裂解液置冰上或-20℃保存备用。

注意：含Guanidinium Lysis Buffer的样品在进行SDS-PAGE电泳前，需经过稀释、透析或TCA沉淀，以防造成SDS沉淀。

蛋白纯化—非变性条件

用事先准备好的Native Binding，Wash和Elution缓冲液，柱子、非变性细胞裂解液进行蛋白纯化。

材料:

各Buffer的成份见第3页

- 3M 咪唑
- NaOH
- HCl
- 含Native Buffer的Ni-NTA柱子
- 灭菌的蒸馏水
- 非变性纯化缓冲液
- 非变性裂解液

注意：不要使用强还原剂或强螯合剂，比如DTT，EDTA和EGTA。这些试剂会降低树脂只不过的镍离子或剥离柱子中的镍离子。

Ni-NTA柱子:

- 将瓶中的Ni-NTA 琼脂糖珠子重新悬起
- 吸取1.5ml珠子，加入10ml纯化柱中，树脂可能会因重力作用而沉降。
- 加入6ml 灭菌的蒸馏水，重新悬起树脂
- 使树脂在重力作用系慢慢沉降，吸去上清液
- 加入6ml Native Binding Buffer
- 重悬树脂，并使树脂在重力作用下沉降
- 缓慢的吸去上清液
- 重复上述步骤

注意：含有树脂的预处理柱，可以添加0.02%的叠氮化物或20%的乙醇或多聚甲醛于室温下保存。

蛋白纯化方案—非变性条件:

- 向含树脂的蛋白纯化柱中加入8ml准备好的非变性裂解液
- 轻轻摇动30-60min，以使裂解液中的树脂和裂解液充分结合
- 待树脂在重力作用下沉降后，轻轻吸取上清液，4℃保存用作SDS-PAGE分析
- 用8ml Native Wash Buffer洗涤树脂，轻轻吸取上清液，4℃保存用作SDS-PAGE分析
- 重复上述步骤4次
- 用8-12ml Native Elution Buffer洗脱蛋白。每1ml洗脱液收集一管，用作SDS-PAGE分析。

注意：洗脱液可在4℃保存。也可加入甘油在-20℃保存。如果长期保存，需加入蛋白酶抑制剂。

用过的树脂，可再次用来纯化相同的重组蛋白。使用0.5M的NaOH清洗树脂30分钟，并在适当的Binding Buffer中重悬。关于树脂的活化，请参阅第8页。

蛋白纯化—变性条件

用事先准备好的Denaturing Binding，Wash和Elution缓冲液，柱子、变性细胞裂解液进行蛋白纯化。

材料:

- 变性Ni-NTA Agarose
- 变性细胞裂解液
- 变性Binding Buffer
- 变性Wash Buffer
- 变性Elution Buffer

Ni-NTA柱的准备:

- 将瓶中的Ni-NTA 琼脂糖珠子重新悬起
- 吸取1.5ml珠子，加入10ml纯化柱中，树脂可能会因重力作用而沉降。
- 加入6ml 灭菌的蒸馏水，重新悬起树脂
- 待树脂在重力作用下沉降后，轻轻吸取上清液。
- 加入6ml 变性Native Binding Buffer
- 重悬树脂，并使树脂在重力作用下沉降
- 缓缓吸去上清
- 重复步骤5-7

注意：含有树脂的预处理柱，可以添加0.02%的叠氮化物或20%的乙醇或多聚甲醛于室温下保存。

蛋白纯化—变性条件:

- 向含树脂的蛋白纯化柱中加入8ml准备好的变性裂解液
- 轻轻摇动30-60min，以使裂解液中的树脂和裂解液充分结合
- 待树脂在重力作用下沉降后，轻轻吸取上清液，4℃保存用作SDS-PAGE分析
- 用4ml Denaturing Bingding Buffer洗涤树脂，待树脂在重力作用下沉降后，轻轻吸取上清液，4℃保存用作SDS-PAGE分析
- 加入4ml pH 5.3的Denaturing Wash Buffer，待树脂在重力作用下沉降后，小心的吸取上清液置4℃保存，留待SDS-PAGE分析用。重复此步骤1次。

- 加入5ml Denaturing Elution Buffer洗脱蛋白。每1ml洗脱液收集一管，测定OD280值。将OD280最高的洗脱液收集在一起，用10mM Tris，pH8.0，0.1%的Triton X-100过夜透析，去除蛋白中的尿素。将透析产物进行浓缩，可用各种办法，比如真空浓缩仪。

用过的树脂，可再次用来纯化相同的重组蛋白。使用0.5M的NaOH清洗树脂30分钟，并在适当的Binding Buffer中重悬。关于树脂的活化，请参阅第2页。

蛋白纯化—符合条件

当你的目的蛋白不可溶，而蛋白的活性又非常重要时，可使用下列纯化方案。该方法具有通用性，但并不适用于所有的蛋白。

材料:

各buffer的成份可见第3页

- 变性细胞裂解液
- 含Ni-NTA树脂的变性纯化柱
- 变性binding buffer
- 变性wash buffer
- 非变性wash buffer
- 非变性elution buffer

Ni-NTA柱子的准备:

纯化柱按照变性条件来准备

蛋白纯化—复合条件下:

- 向准备好的纯化柱中加入8ml变性裂解液
- 轻轻摇动30-60min，以使裂解液中的树脂和裂解液充分结合
- 待树脂在重力作用下沉降后，轻轻吸取上清液，4℃保存用作SDS-PAGE分析
- 用4ml Denaturing Bingding Buffer洗涤树脂，待树脂在重力作用下沉降后，轻轻吸取上清液，4℃保存用作SDS-PAGE分析
- 用8ml Native Wash buffer重悬树脂，作用2min。使树脂在重力作用下缓缓沉降，吸取上清于4℃保存，待SDS-PAGE分析用。
- 用8-12ml的Native Elution Buffer洗脱。每1ml洗脱液收集一管做SDS-PAGE分析

用过的树脂，可再次用来纯化相同的重组蛋白。使用0.5M的NaOH清洗树脂30分钟，并在适当的Binding Buffer中重悬。关于树脂的活化，请参阅第2页。

Ni-NTA树脂的活化

按照下列顺序活化Ni-NTA树脂:

- 用2ml 7M的盐酸胍洗涤1ml树脂
- 用5ml 蒸馏水洗涤树脂
- 用3ml 2% SDS洗涤树脂
- 用5ml 蒸馏水洗涤树脂
- 用5ml EtOH洗涤树脂
- 用5ml蒸馏水洗涤树脂
- 用5ml pH 8，100mM EDTA洗脱2+价Ni离子
- 用5ml蒸馏水洗涤树脂
- 用5ml 100mM的硫酸镍洗涤树脂
- 用10ml 蒸馏水洗涤树脂
- 将树脂于0.02%的叠氮化物或20%乙醇保存

各溶液成份

10x储存液A

200mM 磷酸二氢钠 ---------- 27.6g
5M NaCl ---------- 292.9g
补蒸馏水至 ---------- 1L

10x储存液B

200mM 磷酸二氢钠 ---------- 28.4g
5M NaCl ---------- 292.9g
补蒸馏水至 ---------- 1L

5x Native Purification Buffer

250mM 磷酸二氢钠 ---------- 7g
2.5 M NaCl ---------- 29.2g
蒸馏水至 ---------- 200ml
*在调整体积至200ml前应条pH至8.0

3M 咪唑（pH 6.0）

3M 咪唑 ---------- 20.6g
10x stock buffer A ---------- 8.77ml
10x stock bufferB ---------- 1.23ml
调节pH值至6.0
蒸馏水定容至 ---------- 100ml

Native Binding Buffer

5x Purification Buffer ---------- 6 mL
3 M Imidazole, pH 6.0 ---------- 100 µL
调节 pH 至8.0
蒸馏水定容至 ---------- 30ml

Native Wash Buffer

5x Purification Buffer ---------- 10 mL
3 M Imidazole, pH 6.0 ---------- 335 µL
调整pH至8.0
蒸馏水定容至 ---------- 50ml

Native Elution Buffer

5x Purification Buffer ---------- 3 mL
3 M 咪唑, pH 6.0 ---------- 1.25 mL
调整pH至8.0
蒸馏水定容至 ---------- 15ml

Guanidinium Lysis Buffer

Guanidine Hydrochloride ---------- 57.3 g
10x Stock Solution A ---------- 0.58 mL
10x Stock Solution B ---------- 9.42 mL
调节pH至7.8
蒸馏水定容至 ---------- 100ml
过滤除菌用0.45µm的滤膜

Denaturing Binding Buffer

Urea ---------- 48.1 g

10x Stock Solution A ---------- 0.58 mL
10x Stock Solution B ---------- 9.42 mL
调节pH至7.8
蒸馏水定容至 ---------- 100ml
过滤除菌采用0.45μm滤膜

Denaturing Wash Buffer

Urea ---------- 48.1 g
10x Stock Solution A ---------- 7.38 mL
10x Stock Solution B ---------- 2.62 mL
调节pH至6.0
蒸馏水定容至 ---------- 100ml
过滤除菌采用0.45μm的膜

Denaturing Elution Buffer

Urea ---------- 48.1 g
10x Stock Solution A ---------- 10 mL
调节pH至4.0
蒸馏水定容至 ---------- 100ml
过滤除菌采用0.45 μm的滤膜

疑难解答

问题	原因	解决方案
His-tagged蛋白在洗脱液和洗涤液中均存在	超载蛋白装载	蛋白较少或使用了更多的树脂
纯化的蛋白污染了非特异性蛋白	洗涤步骤要求不严格	pH较低或加入了过量的咪唑， 树脂可多次洗涤
目的蛋白不存在于洗脱液中	- 样品上样量少 - 蛋白表达水平低 - 蛋白对Ni-NTA亲和力高	- 样品上样量太多 - 根据指南中提供的方法优化表达 - 降低elution buffer的pH或提高咪唑的含量