

描述: Ni-NTA Resin 是用于纯化 6×His 标签重组蛋白的一种纯化介质, 它是由 4%交联的 Sepharose 耦连了一种四齿螯合剂 NTA 而得. 它可用于在非变性或变性条件下纯化任何表达系统表达的 6xHis 标签重组蛋白。NTA, 含有四个螯合区, 较一般的三齿螯合剂能更好的结合 Ni^{2+} 。6×His 可与 Ni^{2+} 螯合, 从而使 His 标签蛋白结合在 Ni-NTA 纯化介质上, 未结合的蛋白被洗涤下去, 结合在介质上的蛋白经过一定浓度的咪唑或低 PH 缓冲液被温和的洗脱下来, 从而得到高纯度的目的蛋白。

主要特征

- ◆ 该纯化介质与 His 标签蛋白具有极高的亲和力, 可达 5-20 mg/ml。
- ◆ 可在非变性和变性条件下纯化任何表达系统所得的 His 标签蛋白。
- ◆ 纯化程序简单, 所得的蛋白纯度可高达 95%。
- ◆ Ni-NTA 可再生 4-6 次, 重复使用。

组成: 50%的悬浮液 (20%乙醇), 已螯合 Ni^{2+} 。

应用

- ◆ His 标签蛋白的纯化。
- ◆ 蛋白结构与功能研究。
- ◆ 蛋白-蛋白以及蛋白-DNA 之间相互作用的研究。
- ◆ 配体-受体之间相互作用的研究。

储存: 4℃保存, 可保存 2 年。

操作方法

A. 非变性条件下抽提 His 标签蛋白

1. 样品准备

1) 准备细胞, 接种, 诱导表达。对于实验室用的 pET 载体表达系列, 在细胞 OD600=0.5-0.8 时, 用 1 mM IPTG 诱导 1-3 小时, 可以获得理想的表达效率。收集细胞, 置于-70℃或立即进行步骤 2 操作。

2) 加入 1/20 细胞生长体积的 NTA-0 Buffer (20 mM

Tris-HCl pH7.9, 0.5 M NaCl, 10% Glycerol) 和 1 mM PMSF。

注意: PMSF 见水分解, 需要在使用前加入。

3) 将细胞悬浮起来, 超声或匀浆破碎细胞。该步骤冰上操作。

4) 加入 10% Triton X-100, 使终浓度为 0.05%, 充分混匀, 冰上放置 15 分钟。

5) 13,000 转/分(20,000xg 以上), 4℃离心 15min。取上清, 置于冰上备用或-20℃保存。

2. 层析

1) 将 NTA 树脂装入合适的层析柱, 层析用 10 倍 NTA 体积的 NTA-0 Buffer 平衡填料。

2) 将上清样品加至 NTA 层析柱中, 流速在 15 ml/h 左右, 收集穿透部分, 用于 SDS/PAGE 分析蛋白质的结合情况。

3) 层析用 5 倍 NTA 体积的 NTA-0 Buffer 洗涤填料, 流速控制在 30 ml/h 左右。

4) 再分别用 5 倍 NTA 体积的 NTA-20、NTA-50、NTA-100、NTA-250 洗脱填料, 流速控制在 15 ml/h 左右, 收集洗脱液, 每管收集一个 NTA 体积。

5) 确定目标蛋白质在洗脱液中的分布情况。最为有效的方式是 SDS/PAGE 分析。也可以用 Bradford 蛋白质测定试剂盒, 快速确定蛋白质的含量, 然后用 SDS/PAGE 分析蛋白质的分布。

6) 目标蛋白质需要进一步纯化需要根据蛋白质的用途确定。纯化的目标蛋白质的保存条件需要根据蛋白质的性质和用途确定。

3. 溶液配方

NTA-0 Buffer:

20 mM Tris-HCl pH7.9, 0.5 M NaCl, 10% Glycerol,

NTA-20 Buffer:

20 mM Tris-HCl pH7.9, 0.5 M NaCl, 10% Glycerol,
20 mM Imidazole(咪唑)

NTA-50 Buffer:

20 mM Tris-HCl pH7.9, 0.5 M NaCl, 10% Glycerol,

50 mM Imidazole(咪唑)

NTA-100 Buffer:

20 mM Tris-HCl pH7.9, 0.5 M NaCl, 10% Glycerol,

100 mM Imidazole(咪唑)

NTA-250 Buffer:

20 mM Tris-HCl pH7.9, 0.5 M NaCl, 10% Glycerol,

250 mM Imidazole(咪唑)

B. 变性条件下从包涵体中纯化 His 标签蛋白

1. 样品准备

1) 准备细胞，接种，诱导表达。对于实验室用的 pET 载体表达系列，在细胞 OD₆₀₀=0.5-0.8 时，用 1 mM IPTG 诱导 1-3 小时，可以获得理想的表达效率。收集细胞，置于-70℃或立即进行步骤 2 操作。

2) 加入 1/20 细胞生长体积的 GuNTA-0 Buffer 和 1 mM PMSF。

注意：PMSF 见水分解，需要在使用前加入。

3) 将细胞悬浮起来，冰上超声破碎细胞。

4) 室温放置 30 分钟，间或混匀或用磁力搅拌。

5) 13,000 转/分，4℃ 离心 15min。取上清，置于冰上备用或-20℃ 保存。

2. 层析

1) 将 NTA 树脂装入合适的层析柱，层析用 10 倍 NTA 体积的 GuNTA-0 Buffer 洗。

2) 将样品加到 NTA 层析柱中，流速控制在 15 ml/h 左右，收集穿透部分，用于 SDS/PAGE 分析蛋白质的结合情况。

3) 层析用 5 倍 NTA 体积的 GuNTA-0 Buffer 洗，流速控制在 30 ml/h 左右。

4) 分别用 5 倍 NTA 体积 GuNTA-20、GuNTA-50、GuNTA-100、GuNTA-250 洗脱，流速在 15 ml/h 左右，收集洗脱液，每管收集一个 NTA 体积。

5) 确定目标蛋白质在洗脱液中的分布情况。最为有效的方式是 SDS/PAGE 分析。也可以用 Bradford 蛋白质测定试剂

盒，快速确定蛋白质的含量，然后用 SDS/PAGE 分析蛋白质的分布。

6) 目标蛋白质需要进一步纯化需要根据蛋白质的用途确定。

7) 纯化的目标蛋白质需要复性，复性常用的手段可以参考有关手册确定的原则，根据蛋白质的特性来摸索具体的方案。

3. 溶液配方

GuNTA-0 Buffer:

20 mM Tris-HCl pH7.9, 0.5 M NaCl, 10% Glycerol,

6 M Guanidium HCl

GuNTA-20 Buffer:

20 mM Tris-HCl pH7.9, 0.5 M NaCl, 10% Glycerol,

6 M Guanidium HCl, 20 mM Imidazole

GuNTA-50 Buffer:

20 mM Tris-HCl pH7.9, 0.5 M NaCl, 10% Glycerol,

6 M Guanidium HCl, 50 mM Imidazole

GuNTA-100 Buffer:

20 mM Tris-HCl pH7.9, 0.5 M NaCl, 10% Glycerol,

6 M Guanidium HCl, 100 mM Imidazole

GuNTA-250 Buffer:

20 mM Tris-HCl pH7.9, 0.5 M NaCl, 10% Glycerol,

6 M Guanidium HCl, 250 mM Imidazole

附：NTA 树脂的再生

NTA 树脂在使用若干次数（3-5 次）后，结合效率有所下降，可以用以下方法再生，提高树脂的使用寿命和蛋白质的结合效率。NTA 树脂再生前需要从层析柱下端流干所有溶液，估计出 NTA 的树脂体积，按下列次序将再生试剂加到层析柱里，在等上一再生溶液流干后，再加下一再生溶解。用户需要自行准备 25%、50%、75%、100%（v/v）乙醇和去离子水。

NTA 再生步骤:

- (1) 从层析柱下端流干所有溶液, 用 2 倍 NTA 树脂体积的 Stripping Solution I 洗。
- (2) 用 2 倍体积的去离子水洗。
- (3) 用 3 倍体积的 Stripping Solution II 洗。
- (4) 用 1 倍体积的 25%乙醇洗。
- (5) 用 1 倍体积的 50%乙醇洗。
- (6) 用 1 倍体积的 75%乙醇洗。
- (7) 用 5 倍体积的 100%乙醇洗。
- (8) 用 1 倍体积的 75%乙醇洗。
- (9) 用 1 倍体积的 50%乙醇洗。
- (10) 用 1 倍体积的 25%乙醇洗。
- (11) 用 1 倍体积的去离子水洗。
- (12) 用 5 倍体积的 Stripping Solution III 洗。
- (13) 用 3 倍体积的去离子水洗。
- (14) 如果立即使用, 用 5 倍体积的 Ni Charging Solution 洗, 再用 10 倍体积的平衡溶液 (NTA-0 Buffer 或 GuNTA-0 Buffer) 洗。
- (15) 如果想长期储存, 加入 1 倍体积的 20%乙醇, 4°C 保存, 使用前需要执行步骤 14。

注: Stripping Solution I:

6M GuHCl, 0.2M acetic acid

Stripping Solution II:

2% SDS

Stripping Solution III:

100 mM EDTA, pH 8.0

Ni Charging Solution:

100 mM NiSO₄