

镍离子金属螯合亲和层析介质 (Ni-NTA) 说明书

一、 简介

金属螯合亲和层析介质，又称固定金属离子亲和色谱，其原理是利用蛋白质表面的一些氨基酸，如组氨酸能与多种过渡金属离子如Cu²⁺，Zn²⁺，Ni²⁺，Co²⁺，Fe³⁺发生特殊的相互作用，能够吸附富含这类氨基酸的蛋白质，从而达到分离纯化的目的。因此，偶联这些金属离子的琼脂糖凝胶就能够选择性地分离出这些含有多个组氨酸的蛋白以及对金属离子有吸附作用的多肽、蛋白和核苷酸。半胱氨酸和色氨酸也能与固定金属离子结合，但这种结合力要远小于组氨酸残基与金属离子的结合力。

镍NTA亲和层析介质 (Ni-NTA) 具有特异性好、流速快的优点，颗粒粒度均匀，粒径小，并且螯合镍更稳定，能耐受更高的还原剂，物理和化学稳定性好，批次重复性好。本产品已经螯合好镍离子，使用更方便。

二、 性能参数：

特点

基团密度高，载量大，分辨率高，使用方便

基质

6%的交联琼脂糖凝胶

配体

Ni²⁺

配体密度

20-40 μ mol /ml

吸附载量

15mg蛋白/ml

介质颗粒大小

45-165 μm

最大流速

600cm/h

pH范围

3-10，在位清洗时pH范围可到2-11

保存温度

+4-8 $^{\circ}\text{C}$

保存液体

20%乙醇

三、适用范围

分离带His标签的重组蛋白及能被金属离子吸附的多肽、蛋白、核苷酸、磷酸化蛋白。

(3) 不同金属离子及洗脱条件对纯化效果的影响

使用Ni-NTA Agarose，His标签重组蛋白的上样量为10ml，用含有20、50、100、200、500mM咪唑的缓冲液3洗脱，缓冲液1和2均加入终浓度为1%的吐温80，其结果表明加入表面活性剂可以降低杂吸附。此外分别螯合铜钴金属离子做同样的纯化实验，结果表明在回收率和纯度上都以螯合镍离子的效果最好，其分离纯化的纯度可以 $>90\%$ ，而目标蛋白的回收率高达80%，所以建议首选镍离子螯合填料，别的可以不用考虑。

四、应用注意事项：

镍离子金属螯合亲和层析介质最经典的配体是IDA。镍离子有六个螯合价数，Ni-IDA螯合了三价，剩余三价；而Ni-NTA螯合四价，剩余两价，因此Ni-IDA琼脂糖凝胶作用力要比Ni-NTA琼脂糖凝胶的强。也正因为这个原因，在同样条件下Ni-IDA洗杂质和目标蛋白的要比Ni-NTA的咪唑浓度高，但是NTA的填料更稳定，耐受更强的还原剂，更不容易脱落；而IDA的载量要比NTA高，可以反复利用，更加经济。具体用哪个填料完全看个人的习惯以及纯化的条件而决定。

五、有关操作说明

1、色谱柱装填

- (1) 所有需要用到的材料的温度要与色谱操作的温度一样，液体最好做脱气处理。
- (2) 在柱下端加入蒸馏水，以除去柱中空气，关闭柱出口，在柱内保留少量蒸馏水。
- (3) 将介质连续倒入柱子时，要用玻璃棒紧靠柱子内壁引流，以减少气泡的产生，让介质自然沉降。
- (4) 柱压不超过0.3MPa，如果装柱系统中无法测柱压，则控制流速高于300cm/h，但是在使用中一般只用最大流速的75%。

2、固定金属离子

- (1) 金属离子的固定必须用过滤好的金属离子溶液，以防止金属盐在介质上沉淀。
- (2) 用2-5倍柱床体积的蒸馏水充分平衡柱子。
- (3) 选择合适的金属离子（ Cu^{2+} ， Zn^{2+} ， Ni^{2+} ， Co^{2+} ， Fe^{3+} 等），溶解在中性或弱酸性的溶液中，浓度为0.1~0.3M。如果是 Fe^{3+} 必须在低pH下螯合（pH 3），以防止 Fe^{3+} 产生沉淀。
- (4) 用2-5个柱床体积的金属离子溶液上柱，再用不少于5倍柱床体积的蒸馏水洗涤色谱柱，洗去未螯合的金属离子。（当然也可以把洗净没有螯合的填料直接和需要的金属离子溶液在摇床上震荡过夜，这样螯合效果更好，Ni-NTA Agarose尤其适合用这样的方法。）
- (5) 用2-5倍柱床体积的起始缓冲溶液平衡柱子，再上样。
- (6) 如果是螯合铁离子，要注意的是在中性条件下， Fe^{3+} 很容易被还原而生成沉淀，所以 Fe^{3+} 溶液的pH最好是3-5。螯合 Fe^{3+} 的色谱柱不能长时间保存在中性溶液中。建议每次用完后都要将螯合的 Fe^{3+} 用50 mM EDTA溶液洗净，下次使用时再重新螯合。如果洗不干净，也可以将介质浸在50mM的EDTA中过夜后再清洗保存。

3、上样

- (1) 样品通溶解在pH5.5~8.5的缓冲液中，提高上样缓冲液的pH值，可以增大载量。
- (2) 选择起始缓冲液，主要是依据金属离子的特性及样品与金属离子的结合特性。
- (3) 缓冲液中不能含有EDTA和柠檬酸盐，也最好不含巯基乙醇等还原剂。
- (4) 常用缓冲液有10~20m M磷酸钠盐缓冲液和50mM醋酸钠缓冲液
- (5) 在缓冲液中要加入0.15~0.5M的NaCl，以消除离子交换作用。
- (6) 使用金属螯合层析有一个通常的法则，如果不了解蛋白的结合特性，建议先选用Zn²⁺，缓冲液可以选择中性的磷酸盐或者醋酸盐缓冲液，NaCl的含量为0.15-0.5M，作为起始缓冲液。
- (7) 缓冲液中的去污剂一般不会影响对蛋白的吸附作用。
- (8) 蛋白被吸附时，经常会有一部分的螯合金属离子被替换，这种现象通常是可见的，尤其是使用有色的金属离子时，比如Cu²⁺，所以使用几次后可以先把金属离子洗下来，然后再重新螯合金属离子。

4、洗脱

- (1) 线性降低或一步降低pH，大多数蛋白在pH6-4会被洗脱下来，也可以在pH3-4，缓冲液可以是醋酸钠、柠檬酸、磷酸盐缓冲体系。
- (2) 竞争性洗脱：线性增加或一步增加与金属离子有亲和力的物质，如0-0.5M咪唑（最常用的方法），0-50 mM组氨酸，0-2MNH₄Cl。梯度洗脱最好在起始缓冲液的恒定pH下进行。
- (3) EDTA、EGTA等螯合剂会与金属离子产生作用力，导致蛋白被洗脱下来，这种方法不能使不同的蛋白分离，此外会影响蛋白吸附，导致融合蛋白不能挂柱。
- (4) 所有上述情况中，缓冲液中必须加入0.15~0.5M的NaCl 以消除离子交换作用。
- (5) 当螯合离子配基是Cu²⁺时，有以下的三种操作方式：

降低pH:

上样缓冲液：50 mMNa₂HP0₄， 0.5M NaCl， pH 7.4

洗脱缓冲液：50 mMNa₂HP0₄， 0.5M NaCl， pH 3.5

竞争洗脱：

上样缓冲液：50 mMNa₂HP0₄， 1M NaCl， pH 7.4

洗脱缓冲液：50 mMNa₂HP0₄， 1M NH₄Cl， pH 7.4

脱落洗脱：

上样缓冲液：50 mMNa₂HP0₄， 0.5M NaCl， pH 7.4

洗脱缓冲液：50 mMNa₂HP0₄， 0.5M NaCl， 50 mM EDTA， pH 7.4

使用降低pH和脱落洗脱都会使金属离子掉下来，下次使用就得重新螯合金属离子。

七、再生、清洗、保存

1、凝胶的再生

(1) 螯合一种新的金属离子之前，必须将胶再生。用5~10倍体积的50mM EDTA淋洗柱子，再用2~3倍体积的0.5M NaCl洗掉残留的EDTA。

(2) 金属离子的重新固定的方法如前文所述。在一些操作中，变性蛋白和脂质不能在柱子的再生过程中被洗脱下来，他们可以通过在位清洗被除去。

2、在位清洗

(1) 除去因离子交换作用吸附的蛋白，用2~3倍柱床体积2M NaCl溶液淋洗柱子，再反向淋洗。

(2) 除去蛋白沉淀、疏水性蛋白，用1M NaOH以100cm/h的速度淋洗柱子1h。

(3) 所有操作中，都要用至少3倍柱床体积的初始缓冲液洗柱子。

(4) 除去强的疏水性蛋白和脂质等，用4倍柱床体积的70%的乙醇或者30%的异丙醇洗柱子，再反向淋洗。

八、保存

在20%乙醇中，4°C下长期保存。