

## Ni-NTA Agarose 6FF

KP202 100 毫升

### 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	KP202
Ni-NTA Agarose 6FF	4°C	100 ml

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

### 产品介绍:

本产品对 6×His-tag 蛋白具有显著特异吸附能力, 能够高效一步纯化带有 6 个组氨酸亲和标签蛋白。该产品具有 4 个 Ni<sup>2+</sup> 螯合位点, 较只有 3 个螯合位点的 Ni-IDA 结合 Ni<sup>2+</sup> 更为牢固, 有效防止纯化过程中 Ni<sup>2+</sup> 脱落且增强对 His 标签蛋白的结合能力, 提高纯化效率。较高的基团密度提高了蛋白载量。该产品在天然或变性条件下, 对来源于各种表达系统 (如杆状病毒、哺乳细胞、酵母以及细菌) 中的 His 标签蛋白均有很好的纯化效果。本产品已螯合镍离子, 可直接使用, 方便, 快捷。

支持物: CL-6B 琼脂糖凝胶

载量: 20-30 mg His 标签蛋白/ml 填料粒径: 50-160 μm

### 注意事项

1. 缓冲液中不建议使用β-巯基乙醇、DTT 或 EDTA。
2. 整个纯化过程中切忌凝胶脱水变干。
3. 为提高纯化效率, 首先确定 Binding Buffer 和 Elution Buffer 中咪唑的最佳使用浓度。可以使用线性或梯度浓度的咪唑 (20-500 mM) 洗脱蛋白, 并通过 SDS-PAGE 或 Western Blotting 来检测目的蛋白的纯度。
4. 为避免柱子被堵塞, 请使用高纯度的试剂配制缓冲液, 并通过 0.45μm 过滤器过滤。建议将裂解液进行离心, 使用 0.45μm 过滤器过滤。
5. 柱再生时, 保证每步洗完后都要用足够的去离子水中洗至中性。

**操作步骤: (实验前请先阅读注意事项)**

## 1. 缓冲液的准备

## a. 可溶性蛋白纯化缓冲液配方

成分	Tris-HCl (PH 7.9)	咪唑	氯化钠
Soluble Binding Buffer	20 mM	10 mM	0.5 M
Soluble Elution Buffer	20 mM	500 mM	0.5 M

## b. 包涵体蛋白纯化缓冲液配方

成分	Tris-HCl (PH 7.9)	咪唑	氯化钠	尿素/盐酸胍
Inclusion Body Binding Buffer	20 mM	5 mM	0.5 M	8 M/6 M
Inclusion Body Elution Buffer	20 mM	500 mM	0.5 M	8 M/6 M

## 2. 组装层析柱

- a. 将 Ni-Agarose Resin 填料混匀后加入层析柱, 室温静置 10 分钟, 待凝胶与溶液分层后, 把底部的出液口打开, 让乙醇通过重力作用缓慢流出。

**注意: 填料的上层是乙醇保护层, 将填料和乙醇一起混匀, 以每 ml 填料纯化 20-30mg His 标签蛋白计算, 取需要的填料与乙醇的混合液加入层析柱。**

**本实验是通过重力作用使溶液流出, 如果溶液不流出, 可以给柱子一个外力, 例如用大拇指对柱口轻轻按压一下, 迫使其流出。**

- b. 向装填好的柱中加入 **5 倍柱体积的去离子水**将乙醇冲洗干净后, 再用 **10 倍柱体积的 Binding Buffer** 平衡柱子, 平衡结束后即可上样。

**注意: 柱体积指的是填料的体积。**

## 3. 可溶性蛋白的纯化

- a. 收集菌体后, 每 100mg 菌体 (湿重) 加入 1-5 ml 细菌裂解液, 超声裂解菌体。10,000×g 离心 10 分钟后, 收集上清。

- b. 将上清液过柱, 流速为 10 倍柱体积/小时。
- c. 使用 **15 倍柱体积的 Soluble Binding Buffer** 冲洗柱子, 收集流穿峰。
- d. 使用 **5 倍柱体积的 Soluble Elution Buffer** 洗脱, 收集洗脱峰。
- e. 洗脱后, 依次使用 **3 倍柱体积的 Soluble Binding Buffer** 和 **5 倍柱体积的去离子水** 洗涤柱子, 再用 **3 倍柱体积的 20%乙醇** 平衡 (乙醇要将填料浸没), 封柱后 2-8°C 保存。

#### 4. 包涵体蛋白的纯化

- a. 收集菌体后, 每 100 mg 菌体 (湿重) 加入 **1-5 ml 细菌裂解液**, 超声裂解菌体。
- b. 离心, 弃上清, 将沉淀重悬于 **Soluble Binding Buffer** 中 (如有需要, 可进行超声波处理, 超声前可加入 1-5 mM 磷酸酶抑制剂混合物)。
- c. 重复操作 b, 直至包涵体清洗干净 (呈较洁净的乳白色状)。
- d. 将沉淀重悬于 **Inclusion Body Binding Buffer** 中, 冰浴 1 小时, 使包涵体溶解。
- e. 10,000×g 离心 20 分钟, 将上清以孔径为 0.45μm 的滤膜过滤。
- f. 将蛋白溶液负载上柱, 流速为 10 倍柱体积/小时。
- g. 使用 **15 倍柱体积的 Inclusion Body Binding Buffer** 冲洗柱子, 收集流穿峰。
- h. 使用 **5 倍柱体积的 Inclusion Body Elution Buffer** 洗脱, 收集洗脱峰。
- i. 洗脱后, 依次使用 **3 倍柱体积的 Inclusion Body Binding Buffer** 和 **5 倍柱体积的去离子水** 洗涤柱子, 再用 **3 倍柱体积的 20%乙醇** 平衡 (乙醇要将填料浸没), 封柱后 2-8°C 保存。

**注意: 在纯化包涵体蛋白时, 所有缓冲液均含有变性剂, 需要降低 Binding Buffer 中的咪唑浓度 (5 mM 或更低)。洗脱时, 若蛋白在较高 pH 下洗脱失败, 可以选用低 pH 缓冲液作为洗脱缓冲液 (pH6.5, pH5.9 或 pH4.5)。**

#### 5. 柱再生

当填料使用多次后, 结合效率会有所下降 (表现为流速变慢或填料失去蓝绿色), 可以用以下方法再生, 提高填料的使用寿命和蛋白质的结合效率。

- a. 使用 **2 倍柱体积的 6M 盐酸胍**冲洗后, 使用 **3 倍柱体积的去离子水**冲洗。
- b. 使用 **1 倍柱体积 2% SDS** 冲洗。
- c. 依次使用 **1 倍柱体积的 25%、50%、75%和 5 倍柱体积 100%乙醇**冲洗, 再依次使用 **1 倍柱体积的 75%、50%、25%的乙醇**冲洗。
- d. 使用 **1 倍柱体积的去离子水**冲洗。
- e. 使用 **5 倍柱体积含 50 mM EDTA 缓冲液 (PH8.0)** 冲洗。
- f. 使用 **3 倍柱体积去离子水, 3 倍柱体积 20%乙醇**冲洗。
- g. 封柱后 2-8°C保存。
- h. 再次使用前, 需首先使用 **10 倍柱体积去离子水**冲洗, 然后使用 **5 个柱体积的 50mM NiSO<sub>4</sub>**再生, **3 个柱体积的 Binding Buffer** 平衡。