

Ni-琼脂糖凝胶 H.P. 说明书

货号：AC15802

规格：25mL（凝胶体积）

保存：4°C 保存，有效期至少一年。

产品说明：

Ni-琼脂糖凝胶 H.P. 是用于纯化 6×His 标签重组蛋白的一种纯化介质，它是由 6% 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 6×His 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 Ni²⁺。6×His 可与 Ni²⁺ 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 缓冲液的温和洗脱下来，从而得到高纯度的目的蛋白。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。本产品悬浮液为 20% 乙醇，已螯合 Ni²⁺。

操作方法：

A. 非变性条件下抽提 His 标签蛋白

- 1) 准备细胞，接种，诱导表达。收集细胞，置于 -70°C 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 和 PMSF。PMSF 使用的工作浓度为 1 mM 现用现加。
 - 3) 将细胞悬浮起来，加入溶菌酶，混匀，冰上放置 30 分钟，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) 12000 rpm/min(20,000×g 以上)，4°C 离心 15 分钟以上。取上清，置于冰上备用或 -20°C 保存。
 - 6) 将 NTA 树脂装入合适的层析柱，层析用 10 倍 NTA 体积的 NTA-0 Buffer 洗。
 - 7) 将样品加至 NTA 层析柱中，流速在 15 mL/h 左右，收集穿透部分，用 SDS/PAGE 分析蛋白的结合情况。
 - 8) 层析用 5 倍 NTA 体积的 NTA-0 Buffer 洗，流速控制在 30 mL/h 左右。
 - 9) 分别用 5 倍 NTA 体积的 NTA-20、NTA-40、NTA-60、NTA-80、NTA-100、NTA-200、NTA-1000 Buffer 洗脱，流速控制在 15 mL/h 左右，收集洗脱液，每管收集一个 NTA 体积。
 - 10) 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。
 - 11) 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。
- NTA-0、20、40、60、80、100、200、1000 Buffer 分别为浓度 20 mM Tris-HCl pH7.9, 0.5 M NaCl, 10% Glycerol, 添加 0、20、40、60、80、100、200、1000 mM Imidazole。

B. 变性条件下从包涵体中纯化 His 标签蛋白

- 1) 准备细胞，接种，诱导表达。收集细胞，置于 -70°C 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 PMSF。PMSF 使用的工作浓度为 1 mM 现用现

加。

- 3) 将细胞悬浮起来，冰上超声破碎细胞，降低粘稠度。
- 4) 室温放置 30 分钟，间或混匀或用磁力搅拌。
- 5) 12000 转/分 (20,000×g 以上)，4°C 离心 15 分钟以上。取上清，置于冰上备用或-20°C 保存。
- 6) 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。
- 7) 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。
- 8) 层析用 5 倍 NTA 体积的 GuNTA-0 Buffer 洗，流速控制在 30 mL/h 左右。
- 9) 分别用 5 倍 NTA 体积 GuNTA-20、GuNTA-40，GuNTA-60、GuNTA-100、GuNTA-500 洗脱，流速在 15 mL/h 左右，收集洗脱液，每管收集一个 NTA 体积。
- 10) 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。
- 11) 目标蛋白质需要进一步纯化需要根据蛋白质的用途确定。
- 12) 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。

GuNTA-0、20、40、60、100、500 Buffer 分别为浓度 20 mM Tris-HCl pH7.9, 0.5 M NaCl, 10% Glycerol, 6 M Guanidium HCl 添加 0、20、40、60、100、500 mM Imidazole。

C. 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，在等上一步再生溶液流干后，再加下一步再生溶解。用户需要自行准备 25%、50%、75%、100% (v/v) 乙醇和去离子水。

从层析柱下端流干所有溶液，用 2 倍 NTA 树脂体积的 Stripping Solution I、2 倍体积的去离子水、3 倍体积的 Stripping Solution II、1 倍体积的 25%乙醇、1 倍体积的 50%乙醇、1 倍体积的 75%乙醇、5 倍体积的 100%乙醇、1 倍体积的 75%乙醇、1 倍体积的 50%乙醇、1 倍体积的 25%乙醇、1 倍体积的去离子水、5 倍体积的 Stripping Solution III、3 倍体积的去离子水分别洗一遍。

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；如果想长期储存，加入 1 倍体积的 20%乙醇，4°C 保存，使用前用 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

再生溶液配方：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