



His-Bind Column(Ni-NTA Agarose 6FF)

产品信息:

组成	PA311-01
His-Bind Column(Ni-NTA Agarose 6FF) 5ml	

储存条件: 2-8℃, 避免冷冻

产品简介:

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 个组氨酸亲和标签的蛋白。该产品具有 4 个 Ni²⁺螯合位点,较只有 3 个螯合位点的 Ni-IDA 结合 Ni²⁺更为牢固,有效防止纯化过程中 Ni²⁺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 0.45 μm 过滤器过滤。建议将裂解液进行离心,或者使用 0.45 μm 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冲洗至中性。

操作步骤:

1、缓冲液的准备

(1)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

(2)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

- (1)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: 1) 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。

2) 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。

- (2)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

- (1)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。10,000×g 离心 10 分钟后，收集上清。
- (2)将上清液过柱，流速为 10 倍柱体积/小时。
- (3)使用 **15 倍柱体积的 Soluble Binding Buffer** 冲洗柱子，收集流穿峰。
- (4)使用 **5 倍柱体积的 Soluble Elution Buffer** 洗脱，收集洗脱峰。
- (5)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℃ 保存。

4、包涵体蛋白的纯化

- (1)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。
- (2)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）。
- (3)重复操作 2，直至包涵体清洗干净（呈较洁净的乳白色状）。
- (4)将沉淀重悬于 **Inclusion Body Binding Buffer** 中，冰浴 1 小时，使包涵体溶解。
- (5)10,000×g 离心 20 分钟，将上清以孔径为 0.45μm 的滤膜过滤。
- (6)将蛋白溶液负载上柱，流速为 10 倍柱体积/小时。
- (7)使用 **15 倍柱体积的 Inclusion Body Binding Buffer** 冲洗柱子，收集流穿峰。
- (8)使用 **5 倍柱体积的 Inclusion Body Elution Buffer** 洗脱，收集洗脱峰。
- (9)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℃ 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。

- (1)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。
- (2)使用 **1 倍柱体积 2% SDS** 冲洗。
- (3)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。
- (4)使用 **1 倍柱体积的去离子水** 冲洗。
- (5)使用 **5 倍柱体积含 50 mM EDTA 缓冲液（pH8.0）** 冲洗。
- (6)使用 **3 倍柱体积去离子水，3 倍柱体积 20% 乙醇** 冲洗。
- (7)封柱后 2-8℃ 保存。
- (8)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 NiSO₄** 再生，**3 个柱体积的 Binding Buffer** 平衡。

BM190408