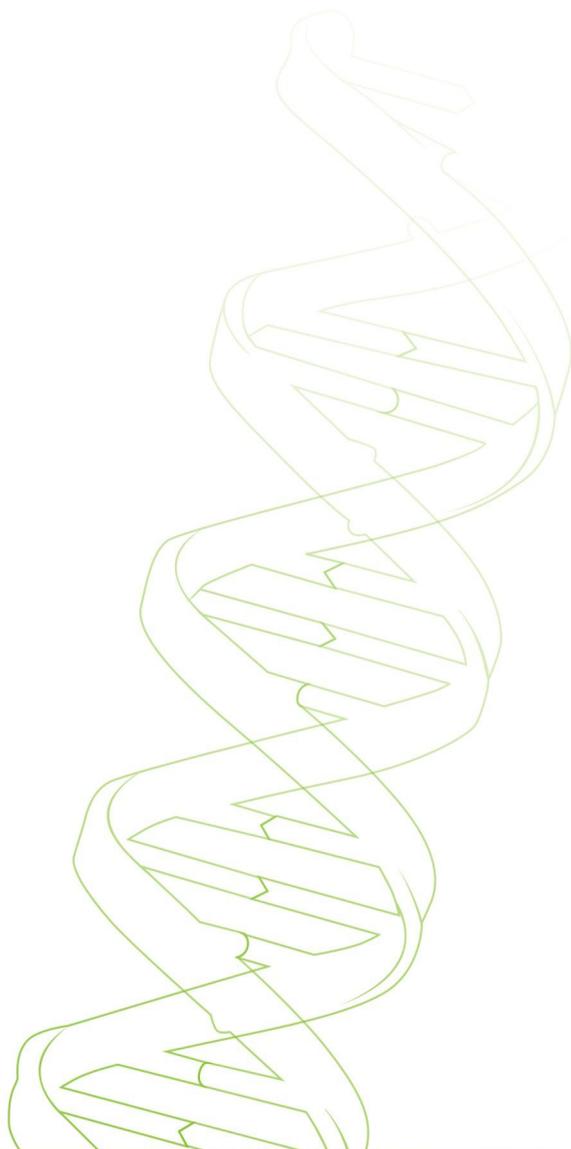


Imagene®

Ni-NTA 蛋白纯化试剂盒



CODONX
RESEARCH & ANSWER MORE

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC PURPOSES

Ni-NTA 蛋白纯化试剂盒

目录号 IM-004K03

使用说明书

网站: www.codonx.com

咨询电话: 010-56315162

技术支持 QQ: 3090544158

1/产品介绍

2/试剂盒组成、储存、稳定性

3/特征参数

4/样品准备

5/样品纯化

6/在位清洗

7/树脂再生

8/常见问题及解决方案

Ni-NTA 蛋白纯化试剂盒

目录号: IM-004K03

目录编号	包装单位
IM-004K03/18	3次(5×)/18次(5×)

1/产品介绍

Ni-NTA 琼脂糖纯化树脂是以6%交联的琼脂糖为基质,通过化学方法偶联了四配位的氮川三乙酸 (NTA) 螯合镍离子 (Ni^{2+}) 后的产品,因其耐压的基质,可以耐受最高0.3MPa的压力,性质更稳定。可以在相对较高的流速下,实现对目的蛋白的纯化。Ni-NTA 树脂可用于各种表达来源(如大肠杆菌、酵母、昆虫细胞和哺乳动物细胞等)的组氨酸标签蛋白的纯化。用低pH溶液、咪唑溶液等洗脱后进行下游实验。

2/试剂盒组成、储存、稳定性

试剂盒组成	储存	IM-004K03	IM-004K18
Ni NTA Beads 6FF 重力柱	2-8°C	1ml×15	1ml×15×6
Ni-Elution Buffer	2-8°C	500ml	500ml×6
Ni-Binding/Wash Buffer	2-8°C	500ml	500ml×6

本试剂盒在 2-8°C 储存,不可冷冻。

3/特征参数

基质	6%交联的琼脂糖微球
蛋白结合能力	约 10-40 mg 组氨酸标签蛋白/mL 基质
存储缓冲液	含 20%乙醇的 1x PBS
填料中的影响因子	螯合剂,例如 EDTA, EGTA, 柠檬酸, 组氨酸等。
最大压力	0.3MPa,3bar

4/样品准备

细菌或大肠杆菌中蛋白在非变性条件下可溶性表达

1. 稀释：每克大肠杆菌菌体加入 5~10mL Binding/Wash Buffer 重悬，样品和 Binding/Wash Buffer 中含同样浓度的咪唑可以避免宿主细胞表达的蛋白质与暴露的组氨酸标签相结合。同时去除大颗粒和高浓度的螯合剂，如 EDTA，组氨酸、柠檬酸等杂质，防止破坏 Ni-NTA 树脂。
2. 裂解：将培养液转移到离心杯中，7000rpm，离心 10min 收集菌体，然后按照菌体:Lysis Buffer=1:10 加入 Lysis Buffer；终浓度 1mM PMSF 或其他蛋白酶抑制剂，注意加入的抑制剂必须对镍柱没有影响。
3. 低温混匀/超声：将菌体混合液振荡混匀，放置于冰上，然后冰上超声破碎细胞 10-20min，至菌液基本保持澄清。
4. 裂解液离心：将澄清的裂解液转移到离心管中在室温或 4°C，12000 rpm 离心 20-30 min，温度的选择取决于蛋白的稳定性。
5. 取上清，置于冰上备用或者 -20°C 保存。

注意：样品粘度越高纯化所需的总时间越长。

包涵体蛋白纯化（变性条件）

1. 将培养液转移到离心管中，在 10,000 rpm 离心 10 min 收集包涵体，用 1X PBS 洗涤 2~3 次包涵体。
2. 按照菌体:Lysis buffer(不含 8M 尿素)=1:10(WNV)将菌体悬浮起来混匀，放置于冰上孵育 30min,可能需要均质或超声将沉淀完全溶解。
3. 12,000 rpm 离心 30 min 以去除剩余的不溶物沉淀，小心的将上清转移到干净的管中而不触碰下面的沉淀。
- 4.按照菌体:Lysis buffer(含 8M 尿素)=1:10(WNV)将包涵体悬浮起来。
- 5.变性条件下进行蛋白纯化。

5/样品纯化

重力法纯化步骤

可以在室温或 4°C 进行纯化。

1. 将重力柱固定在铁架台上，依次去掉下端塞和上端塞，流干重力柱的保护液。
2. 用两倍柱体积的 Binding/Wash Buffer 平衡柱子，使用 0.5~1 mL/min 流速，使 Buffer 缓慢排出树脂。

3. 将蛋白提取物与 Binding/Wash Buffer 1:1 混匀制备样品液，使样品液的总体积是柱体积的两倍。
4. 将样品液加入柱子上，收集流出液到离心管中。如有多余样品可再次上样，重新流通一次可提高样品与填料的结合力。
5. 用两倍柱体积的 Binding/Wash Buffer 清洗柱子并收集流出液。使用一个新的收集管重复这个步骤，直到流出液在 280 nm 处吸光度接近基线。
6. 用两倍柱体积的 Elution Buffer 洗脱柱上的组氨酸标签蛋白，此步骤重复 2 次，每次的洗脱液分别储存，直到洗脱液在 280 nm 处吸光度接近基线。
7. 柱料后处理: 用 5 倍体积 Elution Buffer 洗脱柱料，再用 5 倍体积 Binding/Wash Buffer 平衡柱料，最后用 5 倍体积 ddH₂O 清洗柱料，加入 20%乙醇保护液，置于 2~8°C 保存，不可冻存。
8. 通过测量在 280 nm 处吸光度确定洗脱液中蛋白浓度，洗脱的蛋白可用于 SDS-PAGE 分析。

注意：可用凝胶过滤的方法或透析法去除咪唑。如进行 SDS-PAGE，样品中含 6 M 盐酸胍时必须透析到 8 M 尿素中。如想得到更好的纯化效果，适当延长样品与树脂结合的孵育时间。

离心法纯化步骤

可以在室温或是 4°C 进行纯化。

1. 加入适量的 Ni-NTA 树脂到离心管中，离心管在 3000 rpm 离心 2 min 然后小心的去除上清（保持低速离心，以免损坏柱料）。
2. 加入两倍柱体积的 Binding/Wash Buffer 将缓冲液和树脂完全混匀平衡柱料。
3. 再将离心管在 3000 rpm 离心 2 min 然后小心去除上清。
4. 将蛋白提取物与 Binding/Wash Buffer 1:1 混匀或直接上柱，使混合液总体积相当于两倍树脂体积。
5. 将上步中的样品混合液加入树脂中，再旋转振荡混匀 30 min，使混合液与树脂充分混匀。
6. 将离心管在 3000 rpm 离心 2 min，吸出上清，如需要可将上清留存进行下游分析。
7. 用两倍树脂体积的 Binding/Wash Buffer 清洗，再将离心管在 3000 rpm 离心 2 min 吸出上清，如需要可将上清留存进行下游分析。

8. 重复清洗步骤，通过测量在 280 nm 吸光度，直到洗出液值达到基线值。
9. 用一倍树脂体积的 Elution Buffer 洗脱树脂上的组氨酸标签蛋白，将离心管在 3000 rpm 离心 2 min，然后小心的吸出并保存上清。此步骤重复两次，将每次的洗脱液分别保存。
10. 通过测量在 280 nm 处吸光度确定洗脱液中蛋白浓度，洗脱的蛋白可用于 SDS-PAGE 分析。

6/在位清洗

如果观察到液体流速很慢或显着的树脂污染，可使用在位清洗，通常会使树脂完全恢复性能。我们建议使用以下方法去除污染物如蛋白质沉淀，疏水蛋白和脂蛋白。

在位清洗步骤:

1. 用 15 倍柱体积的 0.5 M 的 NaOH 清洗树脂，最好在 30 min 内清洗完毕并适当调整流量（如用 0.5 M 的 NaOH 清洗 1 mL Ni-NTA 树脂，流速为 0.5 mL/min，总体积为 15 mL）。
2. 用 10 倍柱体积的 1X PBS 重新平衡，平衡好的树脂可进行纯化实验或用 20%的乙醇储存留用。

注意：若需长时间在位清洗或处理大量树脂时建议先将 Ni^{2+} 脱掉（可参照再生步骤），再进行在位清洗步骤，清洗完成后再挂 Ni^{2+} ，保存到 20%的乙醇中。

7/树脂再生

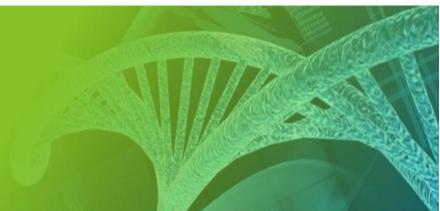
通常再生是不需要的，如果观察到液体流速很慢或显着的树脂污染，可使用在位清洗，通常会使树脂完全恢复性能。若效果不能令人满意，树脂就需要进行再生。

再生步骤:

1. 用 10 倍柱体积的 Stripping Buffer (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 100 mM EDTA, pH 8.0) 进行清洗。
2. 用 10~20 倍柱体积去离子水清洗树脂。
3. 用 5 倍柱体积的 100 mM NiSO_4 （溶解于去离子水中）洗涤树脂。
4. 用 10 倍柱体积的 1X PBS 重新平衡，平衡好的树脂可进行纯化实验或用 20%的乙醇储存留用。

8/常见问题及解决方案

问题	原因	建议
流速很慢	样品粘性太大	1.延长孵育时间，温度从 4°C 变为室温。 2.增加超声前细胞浆的稀释度或超声后细胞浆的稀释度。 3.加入 DNase I（终浓度 5ug/ml）和 Mg ²⁺ （终浓度 1mM），过滤或离心样品。 4.连接真空泵加快流速。
	目标蛋白难溶或是蛋白产生沉淀	1.添加稳定剂，轻轻搅拌 30 min，以帮助蛋白溶解。 注意：Triton X-100 和 Np-40（不是 Tween）在 280 nm 有最高吸收峰，另外洗涤剂不易被透析。针对包涵体蛋白质通常可以从包涵体中溶解（变性），常见的变性剂如 4~6 M 盐酸胍，4~8 M 尿素或强洗涤剂，轻轻搅拌 30 min 以上有助于蛋白质的溶解。 2.操作温度高，建议 2-8°C 条件下操作。
蛋白含量少	目的蛋白结合力强，不易洗脱	再次加入 Elution Buffer 进行洗脱，或增加 Elution Buffer 中咪唑浓度，可高至 500mM。
	目的蛋白结合力弱，洗杂步骤被洗掉了	1.提高 Wash Buffer 的 pH，或降低咪唑浓度。
	蛋白没被洗脱下来	1.蛋白可能是包涵体，没有在上清液中。 2.标签蛋白仍然在柱子上，洗脱时用更高浓度的咪唑溶液。 3.标签蛋白可能在柱子内沉淀。 4.可适当减少样品量。 5.洗脱过程中咪唑浓度变低，增加缓冲液中的咪唑浓度。 6.非特异性疏水作用或其他作用，可以向洗脱缓冲液中添加非离子型去污剂或增加 NaCl 浓度。
洗脱出的组氨酸标签蛋白不纯	在样品和 Binding Buffer 混合液中，咪唑浓度太低	在样品和 Binding Buffer 混合液中用更高浓度的咪唑浓度，推荐浓度约 20~50mM 是推荐浓度。
	标签蛋白可能降解	加入蛋白酶抑制剂（避免 EDTA），并在 4°C 进行操作。
	洗杂操作不彻底	增加 Wash Buffer 的体积
	样品中可能含有标签蛋白	通过调节 pH 值，或者咪唑浓度来优化洗杂条件。



CodonX(China) Biotechnology Co., Ltd

Yizhuang Biomedical Park
Building 6, No. 88 6th Kechuang St. Economic-Technological Development Area, Beijing, China
Tel: 010-56315162 www.codonx.com