

Biolinkedin® His 标签蛋白琼脂糖凝胶 (NTA-Ni)

包装清单

名称	货号	包装
His 标签蛋白	L-2008	10mL (5mL 实体积)
琼脂糖凝胶	L-2008A	25mL (12.5mL 实体积)
(NTA-Ni)	L-2008B	100mL (50mL 实体积)

产品概述

Biolinkedin® His 标签蛋白琼脂糖凝胶 (NTA-Ni) 可以用于各种表达来源 (如大肠杆菌、酵母、昆虫细胞和哺乳动物细胞) 的组氨酸标签 (6xHis-tag) 蛋白的纯化。它是由高度交联的 4% 琼脂糖凝胶为基质, 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, 可以形成比较稳定的平面四边形结构, 从而有更多的位点与组氨酸标签上的咪唑环继续配位, 达到结合目的蛋白的效果。

产品特性

基质	高度交联的 4% 琼脂糖凝胶
配体	氮川三乙酸 (NTA)
螯合金属离子	Ni^{2+}
载量	>40mg 6xHis 蛋白
粒径	45~135 μ m
耐压流速	80~150cm/h (0.3MPa, 3bar)
浓度	凝胶体积占悬浮液体积的 50%
储存缓冲液	含 20% 乙醇的 1xPBS
保质期	在 2~8°C 稳定保存两年

操作流程

1. 准备 buffer

结合/平衡缓冲液、洗涤缓冲液和洗脱缓冲液等缓冲液请自行准备或购买我司 His 标签蛋白纯化试剂盒。

2. 样品准备

以大肠杆菌表达系统, 500mL 诱导菌液为例。

- 1) 4°C 离心 30min (4000xg) 收集菌体, 弃上清。
- 2) 用预冷结合/平衡缓冲液重悬菌体, 如果需要, 可加入适量的抑制剂, 如蛋白酶抑制剂 (PMSF) 或其他蛋白酶抑制剂等。

注意: 加入的抑制剂不能对 His 标签蛋白琼脂糖凝胶 (NTA-Ni) 的性能有影响, 破碎液中不能含有 EDTA、EGTA 等螯合剂, DTT、巯基乙醇等还原剂, 尿素、盐酸胍等变性剂。

3) 用超声波破碎法在冰上破碎菌体, 直到样品破碎完全。

可选: 如果裂解物太粘稠, 可以加入 RNase A (终浓度 10 μ g/mL) 和 DNase I (终浓度 5 μ g/mL) 并在冰上孵育 10~15min。

4) 4°C 离心 20min (12,000xg), 分离上清和沉淀, 并过滤除杂。将上清和沉淀留样以备后续检测。

3. 纯化重组 His 标签融合蛋白

1) 轻轻重悬 His 标签蛋白琼脂糖凝胶 (NTA-Ni)。

2) 吸取 2mL 的 His 标签蛋白琼脂糖凝胶 (NTA-Ni) 加至层析柱中, 用 10mL 结合/平衡缓冲液平衡 His 标签蛋白琼脂糖凝胶 (NTA-Ni)。重复上述步骤 1 次。

3) 关闭层析柱下出口, 将制备好的含有 His 标签蛋白上清加入到层析柱中, 再盖紧层析柱上进口, 建议封口膜密封。置于混匀仪上, 室温孵育 1~2h。(也可置于 2~8°C 孵育 2~4h 或者过夜)

4) 孵育结束后, 打开层析柱上下进出口, 待上清液全部流出层析柱后, 收集上清液, 作为流穿, 置于 2~8°C, 以备后续检测。

5) 立刻加入 10mL 洗涤缓冲液至层析柱中, 收集洗杂液, 置于 2~8°C, 以备后续检测。重复上述步骤 4 次。

6) **常规洗脱:** 加入 1mL 洗脱缓冲液, 用 1.5mL 的 Ep 管收集洗脱液。分别收集 5~10 管。

备注: 如需优化洗脱步骤, 也可采用梯度洗脱方式。

梯度洗脱: 采用不同浓度咪唑分别进行洗脱, 并收集洗脱液。

7) SDS-PAGE 检测

将得到的样品 (包括流穿、洗涤液和洗脱液) 以及原始样品使用 SDS-PAGE 检测纯化效果。加入适量蛋白快速染色液浸没 PAGE 胶, 然后置于摇床上摇动, 染色 10~30min 即可观测结果。

注: 目的蛋白保存前应透析或者超滤以去除咪唑等杂质, 再分装冻存到 -80°C。

(可选) 凝胶再生及储存

凝胶再生步骤请参考或直接购买我司 His 标签蛋白纯化再生试剂盒。

凝胶再生后，可以立即使用，如不立即使用，需要将凝胶悬浮于等体积的 20%乙醇中，置于 2~8°C 保存。

相关产品

货号	产品名称
L-2001	His 标签蛋白琼脂糖凝胶 (IDA-Ni)
L-2005	His 标签蛋白琼脂糖凝胶 (IDA-Co)
L-2006	His 标签蛋白琼脂糖凝胶 (IDA-Cu)
L-2007	His 标签蛋白琼脂糖凝胶 (IDA-Zn)
L-2008	His 标签蛋白琼脂糖凝胶 (NTA-Ni)
L-2009	His 标签蛋白琼脂糖凝胶 (NTA-Co)
L-2010	His 标签蛋白琼脂糖凝胶 (NTA-Cu)
L-2011	His 标签蛋白琼脂糖凝胶 (NTA-Zn)

问题解决

问题	原因	解决方案
洗脱液中 没有 目的蛋白	蛋白可能是包涵体，上清无蛋白	可以通过电泳检测裂解液分析上清中是否含有目的蛋白，包涵体蛋白需要按照包涵体蛋白的纯化方式。
	表达量太低	优化表达条件
	目的蛋白结合比较弱，在洗杂步骤被洗下来了	降低咪唑浓度。
	目的蛋白被蛋白酶降解	在裂解步骤或洗涤步骤加入适量的蛋白酶抑制剂，如 PMSF。
	目的蛋白不能有效地从凝胶上洗脱下来	增加其中咪唑浓度 使用 10~100mM EDTA 溶液剥离镍离子，同时得到目的蛋白
纯化的目的蛋白不纯	洗杂不彻底	增加洗涤次数。
	样品中含有其他的组氨酸标签蛋白	通过调节咪唑浓度来优化洗杂条件。然后通过使用其他的纯化方式（如离子交换，疏水等）进一步纯化洗脱组分。
结合过程中蛋白发生沉淀	浓度太大	适当稀释蛋白
	蛋白发生聚集	在样品和所有的缓冲液中添加稳定剂，如 0.1%的 Triton X-100 或者 Tween-20。
	操作温度太高	2~8°C下操作。