

His-Tag Protein purification Kit (Agarose Resin)

His 标签蛋白纯化试剂盒 (琼脂糖树脂法)

产品简介

HisSep Ni-NTA Agarose Resin 以交联的 6%琼脂糖凝胶为基质, 通过化学方法偶联四配位的氮川三乙酸 (NTA) 为配体, 螯合镍离子 (Ni^{2+}) 后, 形成非常稳定的八面体结构, 镍离子处于八面体的中心, 这样的结构可保护镍离子免受小分子的进攻, 更加稳定, 可以耐受一定浓度的还原剂、变性剂或耦合剂等苛刻条件。已经成为实验室纯化 His 标签蛋白不可或缺的树脂之一。

HisSep Ni-NTA Agarose Resin 储存在含 20%乙醇的 1×PBS 中, 填料和保护液的比例为 1:1, 我司官网规格为实际填料的体积。

His 标签蛋白纯化试剂盒 (琼脂糖树脂法)由 HisSep Ni-NTA Agarose Resin、优化预制的缓冲液、重力层析空柱组成, 用于纯化各种表达系统表达的可溶性 His 标签蛋白, 为可溶性 His 标签蛋白的纯化带来了极大的便利。

产品信息

类别	编号	组分名称	20751ES10	保存方式	翌圣货号
Part I	20751-A	HisSep Ni-NTA Agarose Resin His 标签蛋白琼脂糖纯化树脂	10 mL	2~8°C	20502ES
	20751-B	Lysis Buffer (5×)	100 mL	2~8°C	N/A
	20751-C	Wash Buffer (5×)	100 mL	2~8°C	N/A
	20751-D	Elution Buffer	200 mL	2~8°C	N/A
Part II	20751-E	重力层析空柱, 5 mL (50 μm)	10×1 套	RT	20522ES

储存条件

2~8°C保存, 有效期 1 年。

使用说明

1. 缓冲液配制

所用水和 Buffer 在使用前最好用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤除菌。

Lysis Buffer: Lysis Buffer (5×) (20751-B), 使用时用蒸馏水或超纯水稀释成 1×。

Wash Buffer: Wash Buffer (5×) (20751-C), 使用时用蒸馏水或超纯水稀释成 1×。

Elution Buffer: Elution Buffer (20751-D), 可直接使用。

缓冲液使用原理: 低咪唑上样, 高咪唑洗脱。HisSep Ni-NTA Agarose Resin 可以用于可溶性蛋白和包涵体蛋白的纯化, 此试剂盒搭配缓冲液只可用于可溶性 His 标签蛋白纯化。

2. 样品准备

【注】样品在上样前最好用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤, 减少杂质以防阻塞柱子。

1) 细菌表达的蛋白 (本说明以细菌表达蛋白为例)

a. 挑取单菌落到含有适合抗性的 LB 培养基中, 根据载体说明加入相应的诱导剂诱导相应的时间。

b. 表达结束后，将培养液转至离心瓶，7000 rpm，离心 15 min，收集菌体，然后加入 1/10 体积的裂解液 (Lysis buffer) 和 PMSF (Cat#20104ES) (PMSF 在破碎前加入，其终浓度为 1 mM)，同时也可加入其他蛋白酶抑制剂 (如蛋白酶抑制剂 Cocktail (用于 His-Tag 蛋白纯化), Cat#20135ES03)，但不能影响目的蛋白与树脂的结合。

c. 之后加入溶菌酶，使其工作浓度为 1 mg/mL。【注】如果表达的宿主细胞内含 pLysS 或 pLysE，可以不加入溶菌酶。

d. 将菌体沉淀悬浮起来 (如果菌液浓度高，可考虑加入 10 µg/mL RNase A 和 5 µg/mL DNase I)，混匀，置于冰上超声破碎细胞，至菌液基本保持澄清。

e. 收集上述澄清蛋白液，10000 rpm，4°C 离心 20-30 min。取上清，0.22 µm/0.45 µm 滤膜过滤后，置于冰上备用或 -20°C 保存。

2) 酵母、昆虫和哺乳细胞分泌表达的可溶性蛋白

将细胞培养液转移至离心瓶，5000 rpm 离心 10 min，收集上清。如上清中不含 EDTA、组氨酸和还原剂等，即可直接上柱纯化；如含有 EDTA、组氨酸和还原剂等物质，则需用 1×PBS 4°C 下透析后方可上柱。【注】对于大量体积的上清，需加入硫酸铵进行沉淀浓缩，之后经 1×PBS 4°C 下透析后上柱。

3. HisSep Ni-NTA Agarose Resin 重力柱的装填

1) 取重力层析柱，5 mL (20751-E)，装入下垫片，加入适量纯水润洗柱管和垫片，关闭下出口。

2) 将 HisSep Ni-NTA Agarose Resin (20751-A) 混合均匀，用枪头吸取适量浆液加入重力柱中 (填料实际体积占悬液的一半)，打开下出口流干保护液。

3) 加入适量纯水冲洗填料，待柱管中液体重力流干后，关闭下出口。

4) 加入润洗后的上垫片，确保垫片与填料之间没有空隙，且保持水平。

5) 装填好的重力柱可以直接加入 Lysis Buffer 进行平衡，暂不使用时则加入保护液，4°C 保存。

4. 重力柱法纯化

1) 将装填好 HisSep Ni-NTA Agarose Resin 的重力柱用 5 倍柱体积 Lysis Buffer 进行平衡，使填料处于与目的蛋白相同的缓冲液体系下，重复 2-3 次。

2) 将样品加到平衡好的重力柱中，样品保留时间至少 2 min，保证样品和填料充分接触，收集流出液，可以反复上样增加结合效率。

3) 用 10-15 倍柱体积的 Wash Buffer 进行洗杂，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液。必要时可以调整咪唑的浓度进行洗杂。

4) 用 5-10 倍柱体积的 Elution Buffer 洗脱，分段收集，每一个柱体积收集一管，分别检测，既可以保证所有结合的目的蛋白被洗脱，又可以得到高纯度和高浓度的蛋白。

5) 随后依次用 3 倍柱体积的 Lysis Buffer 和 5 倍柱体积的去离子水清洗填料。5 倍柱体积的 20%乙醇平衡填料，最后将填料保存在 20%乙醇的 1×PBS 中，置于 4°C 保存。

5. SDS-PAGE 检测

将纯化过程中得到的样品 (包括原始样品、流出组分、洗杂及洗脱组分等) 利用 SDS-PAGE 进行检测，判定其纯化效果。

6. 填料清洗

当填料使用过程中发现填料上面出现明显的污染时，需对其进行在位清洗 (Cleaning-in-Place, CIP)。建议按照下面操作去除填料上残留的污染物，如沉淀蛋白、疏水蛋白和脂蛋白等。

1) 去除强疏水结合的蛋白，脂蛋白和脂类

使用 30%异丙醇清洗 5-10 个柱体积，接触时间为 15-20 min 可以去除此类污染物。之后再用去离子水清洗 10 倍柱体积。

也可以选择使用含有去污剂的酸性或者碱性溶液，清洗填料 2 倍柱体积。例如含有 0.1-0.5%非离子去污剂的 0.1 M 醋酸溶液，接触时间为 1-2 h。去污剂处理后，需用 70%的乙醇清洗 5 倍柱体积，彻底去除去污剂。最后使用去离子水清洗 10 倍柱体积。

2) 去除离子作用结合的蛋白

使用 1.5 M NaCl 溶液接触 10-15 min，之后用去离子水清洗 10 倍柱体积。

7. 填料再生

His 标签蛋白亲和纯化填料所带的镍离子不需要经常螯合去除和重新挂镍离子。当填料使用过程中发现颜色变浅，或填料载量明显变低时，需要对其进行镍离子剥离及重新挂镍处理，即填料再生。按照下面操作流程进行：

- 1) 使用 5 倍柱体积去离子水清洗填料；
- 2) 使用 5 倍柱体积 100 mM EDTA (pH 8.0) 剥落镍离子；
- 3) 使用 10 倍柱体积去离子水清洗填料；
- 4) 使用 0.5 M NaOH 清洗 5 倍柱体积，停留 10-15 min；
- 5) 使用去离子水清洗填料，直至 pH 中性；
- 6) 使用 3-5 倍柱体积 100 mM NiSO₄ 再生挂镍；
- 7) 使用 10 倍柱体积去离子水清洗。

填料再生后，可立即使用，也可保存在 20%乙醇中，置于 4℃备用。

注意事项

1. 请勿冷冻保存本产品。
2. HisSep Ni-NTA Agarose Resin 使用前一定要充分颠倒若干次，使琼脂糖珠混合均匀。
3. 所有操作过程中，样本需要在 4℃或冰上操作。
4. 本产品仅作科研用途。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。