

M5 Ni-Agarose His 标签蛋白 纯化试剂盒(可溶性蛋白)使用说明书

| 产品名称 | 单位 | 货号 |
|--|-----|----------|
| M5 Ni-Agarose His 标签蛋白 纯化试剂盒(可溶性蛋白) | 5ml | MF207-01 |

【STORAGE】

Protease Inhibitor Cocktail, -20°C; Ni-Agarose Resin, 2-8°C, 避免冷冻; 其它组分, 2-8°C

【产品简介】

本试剂盒包含 Ni-Agarose 填料、亲和柱空柱以及可溶性 His 融合蛋白纯化所需的全部试剂（细菌裂解液、蛋白酶抑制剂混合物、结合缓冲液和洗脱缓冲液组分），使用方便。该镍柱纯化系统对 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。该系统具有 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，大大提高了蛋白载量。该系统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，可直接用可溶性蛋白的纯化，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

【产品组份】

| | |
|--------------------------------------|--------|
| | 5ml |
| Ni-Agarose Resin | 5 ml |
| Bacterial Protein Extraction Reagent | 65 ml |
| 1M Tris-HC (pH7.9) | 15ml |
| 1M Imidazole | 65ml |
| 3M NaCl | 120 ml |
| Protease Inhibitor Cocktail | 700μl |
| Affinity Column (12ml) | 1 set |

【注意事项】

1. 在纯化之前采用电泳检测蛋白的可溶性，本试剂盒只适合于可溶性蛋白的纯化，如需纯化包涵体蛋白，请选择我公司的包涵体蛋白纯化试剂盒，货号为 MF206-01。
2. 缓冲液中不建议使用 β-巯基乙醇、DTT 和 EDTA。
3. 整个纯化过程中切忌凝胶脱水变干。
4. 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。必要时可以使用线性或梯度浓度的咪唑浓度，Binding Buffer 的范围为 0-10 mM，洗脱缓冲液的范围为 10-500 mM 来进行。并通过 SDS-PAGE 或 Western Blotting 来检测目的蛋白的纯度。
5. 请使用高纯度的试剂配制缓冲液，并通过 0.22 μm 或者 0.45 μm 过滤器过滤。为避免柱子被堵塞，建议将裂解液进行离心，或者使用 0.22 μm 或者 0.45 μm 过滤器过滤。
6. 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】

A、缓冲液的准备

可溶性蛋白纯化缓冲液配方:

| 成分 | Tris-HCl (PH 7.9) | Imidazole | NaCl |
|------------------------|-------------------|-----------|-------|
| Soluble Binding Buffer | 20 mM | 10 mM | 0.5 M |
| Soluble Elution Buffer | 20 mM | 500 mM | 0.5 M |

B、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。

C、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（每 1 ml 细菌抽提试剂中已加入 10 μ l 蛋白酶抑制剂混合物），超声裂解菌体。

注意：1) 当提取物粘度高时，建议加入 DNase I 和 Lysozyme。每 1ml 细菌抽提试剂中加入 1 μ l DNase I (1,000U/ml), 2 μ l Lysozyme (50mg/ml), DNase I 和 Lysozyme 可以单独从我公司购买。或者直接从我公司购买细菌蛋白抽提试剂盒（货号 MF185-01）。

2) 超声过程中保持菌液处于冰浴中，超声条件依赖于所使用的超声仪功率，探头种类，容器的大小形状，需实验中摸索，应避免连续超声导致溶液过热，可分成短时间，多次超声，最终以菌液变清即可。

2. 10000 rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 3 分钟，收集上清中的可溶性蛋白。

3. 用 Binding Buffer 将菌体裂解液等倍稀释后负载上柱，流速为 10 倍柱体积/小时，收集流穿液。

注意：1) 本试剂盒中附带有一块筛板，使用时先将筛板加至填料的上层，该筛板可用于杂质较多的蛋白的过滤，防止过多的杂蛋白堵塞柱子的作用。再将处理好的样品负载上柱，但是筛板放入柱子后就不易取出。

2) 通过控制加入的菌体裂解液的速度来控制流速。

4. 使用 15 倍柱体积的 Soluble Binding Buffer 冲洗柱子，洗去杂蛋白。

5. 使用适量 Soluble Elution Buffer 洗脱，收集洗脱峰。

注意：洗脱峰可以分管收集，每 1 ml 收集 1 管，并采用蛋白检测仪监测，收集洗脱峰。

6. 洗脱后，依次使用 10 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°C 保存。

注意：如果是分段梯度洗脱，最大洗脱缓冲液中咪唑浓度未达到 500 mM 时，则使用浓度为 500 mM 的咪唑进行洗脱 10 倍柱体积后，再进行第 6 步的操作。

D、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°C 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 50 mM NiSO₄ 再生，3 个柱体积的 Binding Buffer 平衡。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。