

使用说明书

Instruction Manual

TargetMol
YOUR TARGET MOLECULES

His-tag 蛋白纯化琼脂糖凝胶 NTA-Ni

His Tag Agarose NTA-Nickel

产品描述

TargetMol 的 His-tag 蛋白纯化琼脂糖凝胶 NTA-Ni 采用高度交联的 4% 琼脂糖凝胶作为基质，通过化学偶联技术将氮川三乙酸 (NTA) 固定在基质上。NTA 螯合镍离子 (Ni^{2+}) 后，形成稳定的平面四边形结构，为组氨酸标签上的咪唑环提供多个配位位点，从而高效结合目标蛋白。His-tag 蛋白纯化琼脂糖凝胶适用于从多种表达系统 (如大肠杆菌、酵母、昆虫细胞和哺乳动物细胞) 中纯化带有组氨酸标签的蛋白，即 6xHis-tag 蛋白。

产品特点

- 物理化学稳定性良好
- 配基不易脱落
- 耐用性强
- 使用便捷

产品信息

His-tag 蛋白纯化琼脂糖凝胶 NTA-Ni	特性
基质	高度交联的 4% 琼脂糖微球
粒径	45-135 μm
配体	氮川三乙酸 (NTA)
螯合金属离子	Ni^{2+}
载量	>40 mg His-tag 蛋白
耐压流速	80~150 cm/h (0.3 MPa, 3 bar)
浓度	50% (v/v) 悬液
保存溶液	1×PBS, 含 20%乙醇

产品应用

- 纯化细菌、酵母、昆虫和哺乳动物细胞等分泌或胞内表达的可溶性 His 标签蛋白。
- 纯化变性蛋白；包涵体需变性后再进行纯化。

操作说明

1. 缓冲液准备

以下为常用的缓冲液成分，适用于多数 His 标签蛋白的纯化，使用时可根据需要进行调整。缓冲液在使用前最好使用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤除菌。

- 1) Binding Buffer: 20 mM Phosphate Buffer, 500 mM NaCl, 5~50 mM Imidazole, pH7.4.
- 2) Washing Buffer: 20 mM Phosphate Buffer, 500 mM NaCl, 50~100 mM Imidazole, pH7.4.
- 3) Elution Buffer: 20 mM Phosphate Buffer, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazole, pH7.4.

2. 蛋白样品处理

- 1) 大肠杆菌、酵母等细胞内表达蛋白：用适量 Binding Buffer 稀释表达细胞，加入蛋白酶抑制剂（如 1 mM PMSF 或蛋白酶抑制剂 Cocktail C0001），重悬细胞后冰浴超声裂解细胞，即得到粗蛋白样品。如果样品过于粘稠，可根据需要在粗样品中加入适量核酸酶，冰浴 30 min，以降解核酸。也可以根据实际需要对比蛋白样品进行离心操作。
- 2) 动物细胞胞内表达蛋白：取适量动物细胞，用适量 PBS 洗涤 1 次，吸去上清液，再用适量含 1% (v/v) Triton X-100 或 1% (v/v) NP-40 的 Binding Buffer 重悬，加入蛋白酶抑制剂，冰浴 10 min，即得到粗蛋白样品。
- 3) 胞外表达蛋白：取胞外表达的上清液，用等量的 Binding Buffer 稀释，即得到粗蛋白样品。

3. 纯化重组 His 标签融合蛋白

- 1) 轻轻重悬 His-tag 蛋白纯化琼脂糖凝胶 NTA-Ni，吸取 2 mL 凝胶至层析柱中，用 10 mL Binding Buffer 平衡凝胶。重复平衡步骤一次。
- 2) 关闭层析柱下端出口，将制备好的含 His 标签蛋白的样品加入层析柱。盖紧柱上端口，用封口膜密封。将层析柱置于混匀仪上，在室温下孵育 1-2 h，或置于 2-8°C 下孵育 2-4 h 或过夜。
- 3) 孵育后，打开层析柱上下端口，让上清液完全流出。收集流穿液，存于 2-8°C，以备后续检测。
- 4) 向层析柱中加入 10 mL Washing Buffer，收集洗杂液并保存于 2-8°C 备用。重复洗涤步骤共 4 次。
- 5) 蛋白洗脱
 - a) 常规洗脱：加入 1 mL Elution Buffer，用 1.5 mL 离心管收集洗脱液，每次收集 5-10 管。
注：如需优化洗脱步骤，也可采用梯度洗脱方式。
 - b) 梯度洗脱：使用不同浓度的咪唑进行梯度洗脱，收集各级洗脱液。
注：在保存目标蛋白前，应进行透析或超滤，以去除咪唑等杂质。蛋白分装后，储存于 -80°C 冻存。

4. SDS-PAGE 检测

使用 SDS-PAGE 对纯化过程中得到的样品（包括流出组分、洗杂组分和洗脱组分）以及原始样品进行检测，以评估纯化效果。

5. 凝胶再生

亲和纯化凝胶上的镍离子通常无需频繁剥离和重新挂载。当凝胶颜色变浅或载量显著下降时，应进行镍离子剥离和重新挂载，即凝胶再生。以下是具体操作流程：

- 1) 将凝胶装填在合适的层析柱内
- 2) 用 5 倍柱体积去离子水清洗凝胶。
- 3) 用 5 倍柱体积的 100 mM EDTA 溶液 (pH 8.0) 剥离镍离子。
- 4) 用 10 倍柱体积去离子水清洗凝胶。
- 5) 加入 5 倍柱体积的 0.5 M NaOH 溶液，停留 10-15 min。
- 6) 用去离子水冲洗凝胶，直至洗出液的 pH 恢复中性。
- 7) 用 3-5 倍柱体积的 100 mM NiSO₄ 溶液进行镍离子挂载。
- 8) 用 10 倍柱体积去离子水冲洗凝胶。

注：再生后的凝胶可立即使用。如需长期保存，将凝胶悬浮于等体积的 20% 乙醇溶液中，存于 4-30°C 条件下备用。

保存条件

4°C, 2 年。

注意事项

1. 避免冷冻本产品。
2. 凝胶应保存在储存溶液中，防止干燥。
3. 在从保管管中取出琼脂糖凝胶之前，应充分震荡以确保均匀悬浮。操作过程中注意避免产生气泡。
4. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

