

**Ni琼脂糖凝胶****Ni NTA Beads**

CAT#: RP0080

产品规格: 10 ml

保存条件: 20%乙醇中2-8℃保存。

**包装清单:**

产品编号	产品名称	包装
RP0080	Ni NTA Beads	10 mL
—	说明书	1 份

**产品简介:**

Ni NTA Beads 是以 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 ( $\text{Ni}^{2+}$ ) 后, 可以形成非常稳定的八面体结构, 镍离子处于八面体的中心, 这样的结构保护了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, 较只有 3 个螯合位点的 Ni-IDA 结合  $\text{Ni}^{2+}$  更为牢固, 更有效防止纯化过程中  $\text{Ni}^{2+}$  脱落且增强对 His 标签蛋白的结合能力, 提高纯化效率。

支 持 物: 4%琼脂糖微球

载 量: 30-40mg His 标签蛋白/ml 填料

粒 径: 45-165  $\mu\text{m}$ **注意事项:**

1. 缓冲液中不建议使用  $\beta$ -巯基乙醇、DTT 和 EDTA。
2. 为提高纯化效率, 首先确定结合 buffer 和洗脱 Buffer 中咪唑的最佳使用浓度。可以使用线性或梯度浓度的咪唑 (20-500 mM) 洗脱蛋白, 并通过 SDS-PAGE 或 Western Blotting 来检测目的蛋白的纯度。
3. 请使用高纯度的试剂配制缓冲液, 并通过 0.45  $\mu\text{m}$  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 0.45  $\mu\text{m}$  过滤器过滤。

**操作步骤:****组装层析柱**

1. 将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。
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 倍柱体积的结合 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。

**I 可溶性蛋白的纯化** (可溶性结合 Buffer 和可溶性洗脱 Buffer 配方详见配方 1)

1. 收集菌体后, 每 100 mg 菌体 (湿重) 加入 1-5 ml 细菌裂解液, 超声裂解菌体。
2. 将菌体裂解液负载上柱, 流速为 10 倍柱体积/小时。
3. 使用 15 倍柱体积的 S 可溶性结合 Buffer 冲洗柱子, 收集流穿峰。
4. 使用 5 倍柱体积的可溶性洗脱 Buffer 洗脱, 收集洗脱峰。

5. 洗脱后, 依次使用 3 倍柱体积的可溶性结合 Buffer 和 5 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), 4°C 保存。

## II 包涵体蛋白的纯化 (包涵体结合 Buffer 和 包涵体洗脱 Buffer 配方详见配方 2)

1. 收集菌体后, 每 100 mg 菌体 (湿重) 加入 1-5 ml 细菌裂解液, 超声裂解菌体。  
2. 离心, 弃上清, 将沉淀重悬于可溶性结合 Buffer 中 (如有需要, 可进行超声波处理)。

3. 重复操作 2, 直至包涵体清洗干净 (呈较洁净的乳白色状)。

4. 将沉淀重悬于包涵体结合 Buffer 中, 冰浴 1 小时, 使包涵体溶解。

5. 10,000×g 离心 20 分钟, 将上清以孔径为 0.45 μm 的滤膜过滤。

6. 将蛋白溶液负载上柱, 流速为 10 倍柱体积/小时。

7. 使用 15 倍柱体积的包涵体结合 Buffer 冲洗柱子, 收集流穿峰。

8. 使用 5 倍柱体积的包涵体洗脱 Buffer 洗脱, 收集洗脱峰。

9. 洗脱后, 依次使用 3 倍柱体积的包涵体结合 Buffer 和 5 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), 4°C 保存。

注意: 在纯化包涵体蛋白时, 所有缓冲液均含有变性剂, 需要降低结合 Buffer 中的咪唑浓度 (5mM 或更低)。洗脱时, 若蛋白在较高 pH 下洗脱失败, 可以选用低 pH 缓冲液作为洗脱缓冲液 (pH6.5, pH5.9 或 pH4.5)。

## 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. 4° 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。

## 附配方:

配方 1: 可溶性蛋白纯化缓冲液配方

可溶性结合 buffer: 20 mM Tris-HCl (PH 7.9)、10 mM 咪唑、0.5 M NaCl

可溶性洗脱 buffer: 20 mM Tris-HCl (PH 7.9)、500mM 咪唑、0.5 M NaCl

配方 2: 包涵体蛋白纯化缓冲液配方

包涵体结合 buffer: 20 mM Tris-HCl (PH 7.9)、5 mM 咪唑、0.5 M NaCl、8 M/6 M 尿素/盐酸胍

包涵体洗脱 buffer: 20 mM Tris-HCl (PH 7.9)、500 mM 咪唑、0.5 M NaCl、8 M/6 M 尿素/盐酸胍