



版本号：05/2024

Ni-Agarose Resin

Ni 琼脂糖凝胶

目录号：CW0010S (10 mL)

保存条件：2-8℃，避免冷冻

产品内容

Component	CW0010S 10 mL
Ni-Agarose Resin	10 mL

产品简介

本产品对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。该产品具有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。较高的基团密度提高了蛋白载量。该产品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

注意事项

- 1. 缓冲液中不建议使用 β -巯基乙醇、DTT或EDTA。
- 2. 整个纯化过程中切忌凝胶脱水变干。
- 3. 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。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。
- 4. 为避免柱子被堵塞，请使用高纯度的试剂配制缓冲液，并通过0.45 μ m过滤器过滤。建议将裂解液进行离心，或者使用0.45 μ m过滤器过滤。
- 5. 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

I 缓冲液的准备

- 1. 可溶性蛋白纯化缓冲液配方，参照如下：

组分	20 μ L体系	咪唑	氯化钠
Soluble Binding Buffer	20 mM	10 mM	0.5 M
Soluble Elution Buffer	20 mM	500 mM	0.5 M

- 2. 包涵体蛋白纯化缓冲液配方，参照如下：

组分	Tris-HCl (PH 7.9)	咪唑	氯化钠	尿素/盐酸胍
Soluble Binding Buffer	20 mM	5 mM	0.5 M	8 M/6 M
Soluble Elution Buffer	20 mM	500 mM	0.5 M	8 M/6 M

II 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20-30 mg 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。

III 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, 超声裂解菌体。10,000×g离心10分钟后, 收集上清。
2. 将上清液过柱, 流速为10倍柱体积/小时。
3. 使用15倍柱体积的Soluble Binding Buffer冲洗柱子, 收集流穿峰。
4. 使用5倍柱体积的Soluble Elution Buffer洗脱, 收集洗脱峰。
5. 洗脱后, 依次使用3倍柱体积的Soluble Binding 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), 封柱后2-8℃保存。

IV 包涵体蛋白的纯化

1. 收集菌体后, 每100 mg菌体 (湿重) 加入1-5 mL 细菌裂解液, 超声裂解菌体。
2. 离心, 弃上清, 将沉淀重悬于Soluble Binding Buffer 中 (如有需要, 可进行超声波处理, 超声前可加入1-5 mM 磷酸酶抑制剂混合物)。
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Inclusion Body Binding 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Inclusion Body Binding Buffer冲洗柱子, 收集流穿峰。
8. 使用5倍柱体积的Inclusion Body Elution Buffer洗脱, 收集洗脱峰。
9. 洗脱后, 依次使用3倍柱体积的Inclusion Body Binding 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), 封柱后2-8℃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Binding Buffer中的咪唑浓度 (5 mM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)。

V 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 NiSO_4 再生, 3个柱体积的Binding Buffer平衡。