

## M5 Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒(包涵体蛋白)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(包涵体蛋白)	5ml	MF206-01

### 【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】

该产品为镍柱纯化系统, 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 Ni<sup>2+</sup>螯合位点, 较只有 3 个螯合位点的 Ni-IDA 结合 Ni<sup>2+</sup>更为牢固, 有效防止纯化过程中 Ni<sup>2+</sup>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, 可直接用于包涵体蛋白的纯化, 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
Urea	365g
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, 本试剂盒只适合于包涵体蛋白的纯化, 如需纯化可溶性蛋白, 请选择我公司的可溶性蛋白纯化试剂盒, 货号为 MF207-01。
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 Imidazole (咪唑) 的最佳使用浓度。必要时可以使用线性或梯度浓度的 Imidazole (咪唑) (10-500 mM) 洗脱蛋白, 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。
7. 如果有些蛋白采用尿素的溶解效果不好, 可以采用盐酸胍进行溶解。

## 【操作步骤】

**A、缓冲液的准备**

## 1. 包涵体蛋白纯化缓冲液配方

成分	Tris-HCl (PH 7.9)	咪唑	氯化钠	尿素
Binding Buffer	20 mM	5 mM	0.5 M	8 M
Elution Buffer	20 mM	500 mM	0.5 M	8 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、包涵体蛋白的纯化**

1. 收集菌体后，每 100 mg 菌体（湿重）加入 2 ml 细菌裂解液（每 1 ml 细菌裂解液中请预先加入 10  $\mu$ l 蛋白酶抑制剂混合物），如有需要可以超声裂解菌体。

**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 $\mu$ l DNase I (1,000U/ml), 2 $\mu$ 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. 10,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C 离心 15 分钟，分离上清和沉淀，并收集沉淀。
3. 将沉淀重悬于 Binding Buffer 中，尽量混匀使包涵体充分溶解。
4. 10,000 $\times$ g 离心 20 分钟，收集上清。

**注意：**建议将离心后的上清以孔径为 0.22  $\mu$ m 或者 0.45  $\mu$ m 的滤膜过滤。

5. 将上清负载上柱，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，再将处理好的上清负载上柱。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，但是筛板放入柱子后不易取出。

2) 通过控制加入的上清（菌体裂解液）的速度来控制流速。

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

7. 使用适量 Elution Buffer 洗脱，收集洗脱峰。

**注意：通过蛋白监测仪监测，洗脱峰可以分管收集，每 1 ml 收集 1 管。**

8. 洗脱后，依次使用 5 倍柱体积的 Binding Buffer，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°C 保存。

**注意：1) 在纯化包涵体蛋白时，所有缓冲液均含有变性剂，可以降低 Binding Buffer 中的咪唑浓度（比 5 mM 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）。**

**2) 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，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 8 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 NiSO<sub>4</sub>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。