

PurKine™ 组氨酸标签蛋白纯化试剂盒 (Ni-NTA 树脂)

Cat #: KTP2001

Size: 1 mL / 1 mL×5

	组氨酸标签蛋白纯化试剂盒 (Ni-NTA 树脂)		
	货号: KTP2001		批号: 见产品标签
	载量: >40 mg 6×His-tagged protein/mL		微球粒径: 45-165 μm
	保质期: 4℃保存 12 个月		注意: 打开后按照推荐的存储条件存放

原理

PurKine™ 组氨酸标签蛋白纯化试剂盒采用新型 PurKine™ His-Tag Ni-NTA 树脂, 该树脂能够耐受一定浓度的还原剂、变性剂或偶联剂等恶劣条件, 能够简单、快速、高效、高特异性地纯化 His-Tag 蛋白。PurKine™ His-Tag Ni-NTA 树脂能够有效地固定化金属亲和层析(IMAC)从可溶性蛋白提取物中纯化多聚组氨酸标签的蛋白。该树脂由镍离子氮川三乙酸(NTA)螯合物固定在 4%交联的琼脂糖上形成。由于螯合物上有四个金属结合位点, 这使得它具有高的结合能力和低金属离子的浸出。

包装清单

试剂盒组分	规格		储存条件
	1 mL	1 mL×5	
PurKine™ His-Tag Purification Nickel Column	1 mL	1 mL×5	4℃
Phosphate-Buffered Saline (PBS, 10×)	30 mL	100 mL+50 mL	4℃
Imidazole (2 M)	25 mL	125 mL	4℃

自备耗材

- 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜
- 可调节式移液枪及枪头
- 去离子水
- 用于制备缓冲液的各种器皿

样本制备

细菌或酵母表达蛋白

1. 诱导表达蛋白后, 将细菌或酵母培养液转移至离心管中, 7,000 rpm 离心 15 min, 收集细菌或酵母细胞。
2. 按照菌体: Lysis buffer=1:10 (W/V)的比例加入 Lysis buffer, 加入终浓度 1 mM 的 PMSF。建议加入终浓度 0.2-0.4 mg/mL 的溶菌酶。
3. 重悬细胞。如果细胞浓度较高, 则可加入 10 μg/mL 的 RNase A 和 5 μg/mL 的 DNase I。将悬浮液在冰中混合并超声破碎, 至菌液基本澄清。

4. 将澄清的破碎液转移至新的离心管中，10,000 rpm，4℃离心 20-30 min，取上清，置于冰上待用或-20℃保存。

酵母、昆虫和哺乳细胞分泌表达的可溶性蛋白

1. 将细胞培养液转移至离心管，5,000 rpm 离心 10 min，收集上清。如果上清中含有 EDTA、组氨酸和其他还原剂等物质，需用 Lysis buffer 透析。

2. 对于大量体积的上清，需加入硫酸铵沉淀浓缩后，蛋白还需用 Lysis buffer 透析。

包涵体纯化（变性条件）

1. 将培养液转移至离心管中，7,000 rpm 离心 15 min 收集菌体，弃上清。

2. 按照菌体：Lysis buffer =1:10 (W/V)的比例加入 Lysis buffer，**Lysis buffer 中不含 8 M 尿素**，重悬菌体，冰浴超声破碎。

3. 将破碎液转移至新的离心管中，10,000 rpm，4℃离心 20-30 min。弃上清，重复步骤 2 和 3。

4. 按照菌体：Lysis buffer=1:10 (W/V)的比例加入 Lysis buffer，**Lysis buffer 中含 8 M 尿素**，重悬菌体。

试剂准备

建议在使用之前通过 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤所有缓冲液。对于大多数蛋白质，建议使用以下缓冲液：

试剂	体积		
	10×PBS (mL)	2 M Imidazole (μL)	Water (mL)
Lysis buffer	1	50	8.95
Wash buffer	1	125	8.875
Elution buffer	1	1250	7.75

注意：有时过表达蛋白在包涵体中。**His 标签蛋白的包涵体可溶于 8 M 尿素或 6 M 盐酸胍。**可以使用以下推荐缓冲液：

对于咪唑洗脱法，准备以下缓冲液：

Lysis buffer: 8 M Urea, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0;

Wash buffer: 8 M Urea, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0;

Elution buffer: 8 M Urea, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0.

对于 pH 洗脱法，准备以下缓冲液：

Lysis buffer: 8 M Urea, 100 mM NaH₂PO₄, 100 mM Tris·HCl, pH 8.0;

Wash buffer: 8 M Urea, 100 mM NaH₂PO₄, 100 mM Tris·HCl, pH 6.3;

Elution buffer: 8 M Urea, 100 mM NaH₂PO₄, 100 mM Tris·HCl, pH 4.5.

蛋白纯化流程

1. 固定重力柱，去掉上端塞和下端塞，流干保护液。

2. 向柱中加入 5 倍柱体积的 Lysis Buffer。平衡柱子(使 Ni-NTA 树脂与目标蛋白在相同的缓冲系统中，以保护蛋白)，流干 Lysis Buffer。

3. 将蛋白提取物样本加入树脂中孵育。(为了提高目标蛋白的回收率，控制流速，确保目标蛋白与 Ni²⁺充分接触)。

注意：收集流穿液，可通过 **SDS-PAGE** 分析。出现问题时，更容易找到解决办法。

4. 向柱中加入 10-15 倍柱体积的 Wash Buffer，去除非特异性吸附蛋白。注意收集洗杂液。

5. 向柱中加入 5-10 倍柱体积的 Elution Buffer，收集的洗脱液即是目标蛋白溶液。

6. 依次向柱中加入 3 倍柱体积的 Lysis Buffer 和 5 倍柱体积的去离子水，平衡 Ni-NTA 树脂。为防止树脂被细菌污染，将树脂储存在等体积的含 20%乙醇的 PBS 中，温度为 4-30℃。

7. 通过 SDS-PAGE 分析各组样本，检测纯化效果。

在位清洗 (CIP)

树脂使用过程中发现反压过高和树脂上出现明显污染时，需要进行在位清洗操作 (Cleaning-in-Place, CIP)。建议按照下面操作去除树脂上残留的污染物，如沉淀蛋白，疏水蛋白和脂蛋白。

去除强疏水结合蛋白，脂蛋白和脂类：

通过使用 30%异丙醇清洗 5-10 倍柱体积，接触时间 15-20 min 可去除此类污染物。然后，再使用 10 倍树脂体积的去离子水清洗。也可使用含有去垢剂的酸性或碱性溶液，清洗 2 倍柱体积，如含 0.1-0.5%非离子表面活性剂的 0.1 M 乙酸溶液，接触时间为 1-2 h。最后使用 10 倍柱体积的去离子水清洗。

去除离子作用结合的蛋白：

使用 1.5 M NaCl 溶液清洗 10-15 min。然后再使用去离子水清洗 10 倍柱体积。

填料再生

一般情况下，Ni-NTA 树脂至少可以使用 5 次，然后才需要对其进行再生。当反压过高或载量明显偏低时，需要剥离金属离子，按以下步骤对树脂进行再生：

- 1. 使用 5 倍柱体积去离子水清洗树脂。
- 2. 使用 5 倍柱体积 100 mM EDTA (pH 8.0)剥落镍离子。
- 3. 使用 10 倍柱体积去离子水清洗树脂。
- 4. 使用 0.5 M NaOH 清洗 5 倍柱体积，停留 10-15 min。
- 5. 使用 10 倍柱体积去离子水清洗树脂。
- 6. 使用 3-5 倍柱体积 100 mM NiSO₄再生挂镍。
- 7. 使用 10 倍柱体积去离子水清洗树脂。

树脂再生后可立即使用，或将树脂重悬于等体积含 20%乙醇 PBS 中，置于 4℃保存。

化学相容性

还原剂	5 mM DTE, 0.5-1 mM DTT, 20 mM β-巯基乙醇, 5 mM TCEP, 10 mM 还原型谷胱甘肽
变性剂	8 M 尿素, 6 M 盐酸胍
去垢剂	2% Triton X-100 (非离子), 2% Tween 20 (非离子), 2% NP-40 (非离子), 2% cholate (阴离子), 1% CHAPS (两性离子)
其他添加剂	500 mM 咪唑, 20%乙醇, 50%甘油, 100 mM Na ₂ SO ₄ , 1.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 60 mM 柠檬酸
常用缓冲液	50 mM 磷酸盐, pH 7.4, 100 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM Tris-acetate, pH 7.4, 100 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM MOPS, pH 7.4, 100 mM 乙酸钠, pH 4.0

相关产品

Catalog No.	Product Name
BMR2001	PurKine™ 组氨酸标签 (Ni-NTA 树脂)
ABT2050	His 标签小鼠单克隆抗体 (5C3)
KTP2010	PurKine™ 谷胱甘肽 S 转移酶标签蛋白纯化试剂盒 (谷胱甘肽)
KTP2020	PurKine™ 麦芽糖结合蛋白标签蛋白纯化试剂盒 (糊精)
KTP2030	PurKine™ 生物素标签蛋白纯化试剂盒 (链霉亲和素)
KTP2070	PurKine™ 抗体纯化试剂盒 (蛋白 A/G)
KTP2140	PurKine™ 内毒素清除试剂盒 (多粘菌素 B)

免责声明

本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

