# PurKine™ 组氨酸标签（Ni-NTA）树脂

Cat #: BMR2001 Size: 5 mL/25 mL

| | | | |
|---|---|---|---|
| | **组氨酸标签（Ni-NTA）树脂，4%琼脂糖凝胶** | | |
| REF | **货号：**BMR2001 | LOT | **批号：**见产品标签 |
| | **载量：**>40 mg 6×His-tagged protein/mL | | **微球粒径：**45-165 μm |
| | **最大压力：**0.1 MPa, 1 bar | | **储存液：**含 20%乙醇的 PBS |
| | **保质期：**4℃保存 12 个月 | | |

## 原理

PurKine™ 组氨酸标签（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，因此 Ni-NTA 树脂通常被用于 His 标签蛋白的纯化。此外，Ni-NTA 树脂可耐受一定浓度的还原剂、变性剂或偶联剂等苛刻条件，适用性更广、配体更稳定和更高的选择性。

## 试剂准备

用于配制缓冲液的水和化学试剂需要高纯度，缓冲液使用之前使用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤。对于大多数蛋白质，可以使用以下推荐缓冲液：

Lysis Buffer: 50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl,10 mM Imidazole, pH 8.0 ;

Wash Buffer: 50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 25 mM Imidazole, pH 8.0 ;

Elution Buffer: 50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazole, pH 8.0 ;

**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：**

Lysis buffer: 8 M Urea, 100 mM $NaH_2PO_4$, 100 mM Tris·HCl, pH 8.0 ;

Wash buffer: 8 M Urea, 100 mM $NaH_2PO_4$, 100 mM Tris·HCl, pH 6.3 ;

Elution buffer: 8 M Urea, 100 mM $NaH_2PO_4$, 100 mM Tris·HCl, pH 4.5.

## 样本制备

样品需经过离心或 0.22 μm/0.45 μm 滤膜过滤，以防止堵塞色谱柱。避免使用蛋白酶抑制剂或其他含有螯合剂的添加剂，如 EDTA，或强还原剂，如 DTT 和 β-巯基乙醇，这些会破坏树脂。注意不要超过树脂的载量。

## 实验步骤

1. 用适量的树脂装重力柱，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 $Ni^{2+}$充分接触)。


Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.

**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含 20%乙醇的 PBS 中，温度为 4-30℃。
7. 通过 SDS-PAGE 分析各组分样本。

## 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 $NiSO_4$ 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%乙醇的 PBS 中，置于 4℃保存。

## 相关产品

| Catalog No. | Product Name |
|---|---|
| KTP2001 | PurKine™ 组氨酸标签蛋白纯化试剂盒（Ni-NTA树脂） |
| ABT2050 | His标签小鼠单克隆抗体（5C3） |

## 免责声明

本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。


Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.