

免費服務專線: 4000-855-868 網站: [www.mdbio.com.cn](http://www.mdbio.com.cn) 電子郵件: [mdbio@mdbio.com.cn](mailto:mdbio@mdbio.com.cn)

## 產品名稱 & 產品編號

產品名稱: HisPur Ni-IDA Agarose Gel

產品編號: HI020-10 mL

## 產品介紹

HisPur Ni-IDA Agarose Gel 是一種用於組氨酸 (His-tag) 標籤蛋白純化的亲和凝膠，俗稱鎳柱。其將鎳離子 ( $\text{Ni}^{2+}$ ) 借助 IDA 等配基整合在琼脂糖凝膠微球表面，通過親水間隔臂降低空間位阻，實現對 His 標籤蛋白的高效識別。IDA 利用兩個游離羧基將  $\text{Ni}^{2+}$  整合在琼脂糖微球表面，可快速、高效的實現複雜樣品體系中 His 標籤蛋白的識別及分離。

通常帶有 6 個及以上連續組氨酸標籤的重组蛋白 (6×His-tagged recombinant protein) 被稱為 His 標籤蛋白。當蛋白樣品溶液通過 HisPur Ni-IDA Agarose Gel 時，重组蛋白上的標籤組氨酸殘基能被亲和凝膠特异性捕捉，其它蛋白則不能被識別。洗滌後，His 標籤蛋白可在非變性條件下或者變性條件下通過不同濃度競爭劑被解吸。該亲和凝膠可適用於細菌、哺乳動物細胞、昆蟲及病毒等多種 His 標籤表達系統中蛋白的純化。純化的蛋白可用於結構和功能研究、抗體制備、蛋白與蛋白相互作用、蛋白與核酸相互作用等方面的研究。該凝膠具有良好的穩定性、生物相容性及再生性能，對 pH 環境及尿素、鹽酸胍等變性劑有一定的耐受性，既有利於保持生物樣品活性並可以提高產品收率。

本產品已經整合了  $\text{Ni}^{2+}$ ，呈藍綠色，儲存在 20% 乙醇溶液；易於受到 EDTA/EGTA 等強整合劑的影響造成  $\text{Ni}^{2+}$  離子流失 (<5 mM)，同時 DTT、 $\beta$ -巰基乙醇等還原劑會在一定程度上還原的  $\text{Ni}^{2+}$ ，因此蛋白樣品或者純化過程所使用的溶液限制使用還原劑和整合劑。

鎳柱耐受性 8 M 尿素，6 M 鹽酸胍（吸附量略微降低影響不大，但是鹽酸胍 6M 溶液濃度太高，容易析出鹽酸胍晶體）；EDTA 低於 2 mM，DTT、 $\beta$ -巰基乙醇還原劑盡量不要有，耐受性 0.01 mM。

指標名稱	HisPur Ni-IDA Agarose Gel
配基	-IDA- $\text{Ni}^{2+}$
基质	4% 交聯琼脂糖微球
粒徑	平均 $\sim 75 \mu\text{m}$
工作溫度	4 - 40°C
pH 穩定性	4 - 10 穩定；短時耐受 2 - 14

## 包裝清單

產品編碼	產品名稱	包裝
HI020	HisPur Ni-IDA Agarose Gel	10 mL

## 保存條件

本產品包裝凝膠體積為 10 mL，在 20%乙醇中 4°C 下，常壓，避光長期保存。使用時宜把凝膠充分分散重懸後再吸取備用。

## 使用步驟

### 1. 樣品準備

- a. 細菌中的目的蛋白誘導表達後，離心沉澱細菌。
- b. 按照每克細菌沉澱濕重加入 2-5 mL 裂解液的比例加入裂解液，可添加適量蛋白酶抑制劑充分重懸細菌。本產品兼容 Tris 裂解液體系及磷酸鹽緩衝體系，一般磷酸鹽體系下吸附效果會好一些。
- c. 超聲或其它適當方法裂解細菌，離心取上清。
- d. 樣品溶液過 0.45  $\mu\text{m}$  微孔濾膜。為獲得親和凝膠最佳吸附量，樣品溶液及平衡緩衝液中咪唑濃度不要超過 10 mM。

### 2. 裝柱

取 1 mL 混合均勻的 HisPur Ni-IDA Agarose Gel 裝柱，用相應的裂解液平衡 3-4 次。

### 3. 樣品純化

- a. 細菌中的目的蛋白誘導表達後，離心沉澱細菌。根據待純化蛋白的溶解性，選擇非變性或變性條件進行純化。
- b. 每克細菌沉澱濕重加入 4 mL 裂解液，可添加適量蛋白酶抑制劑，充分重懸細菌。
- c. 冰上超聲裂解細菌，離心取上清。非變性條件下可以先使用溶菌酶處理，然後再進行超聲處理。
- d. 將準備好的 4 mL 細菌裂解液上清上柱，並收集穿流液並重復上柱 3-5 次，以充分結合 His 標籤蛋白。
- e. 非變性條件下，用 0.5-1 mL 洗滌液洗柱 5 次。變性條件下需要先使用 0.5-1 mL 裂解液洗滌 5 次，然後再使用 0.5-1 mL 洗滌液洗柱 5 次。注：如果出現咪唑濃度偏低的情況，可以自行添加適量咪唑，如果出現咪唑濃度偏高的情況，可以使用试剂盒提供的裂解液作為洗滌液使用。

免費服務專線:4000-855-868 網站:www.mdbio.com.cn 電子郵件:mdbio@mdbio.com.cn

f. 用相应 0.5 mL 洗脱液洗脱 6-10 次, 将目标蛋白从填料上洗脱下来, 5000 rpm 离心 2min, 将上清中的目标蛋白转移到离心管中。

注: 通常该洗脱条件会比较理想。如果出现洗脱效果欠佳的情况, 可以自行在洗脱液中额外加入 250mM 的咪唑。洗脱干净。

#### 4. 再生

使用过的亲和凝胶可再生后继续使用。但再生后仅用于相同蛋白的纯化, 并且最多再生 3-4 次。再生程序:

- a. 加入 5~10 倍柱体积的去离子水洗柱一次;
- b. 加入 1 倍柱体积的 0.1 M NaOH 溶液冲洗一次;
- c. 加入 10 倍柱体积的去离子水洗柱一次;
- d. 加入 1 倍柱体积的 25%, 50%, 75%乙醇各洗柱一次;
- e. 加入 5 倍柱体积的去离子水洗柱一次;
- f. 加入 5 倍柱体积的 200 mM EDTA-Na<sub>2</sub> 洗柱一次;
- g. 加入 10 倍柱体积的去离子水洗柱一次;
- h. 加入 5 倍柱体积的 50 mM NiCl<sub>2</sub> 循环洗柱 3 次;
- i. 加入 5 倍柱体积的样品缓冲液液洗柱一次;
- j. 加入 5 倍柱体积的去离子水洗柱一次。

#### 5. 常见问题

若纯化不成功, 可对纯化过程中收集的每个组分进行 SDS-PAGE 电泳检测, 请参考:

- a. 蛋白无法与亲和凝胶结合或蛋白出现降解;
- b. 测序检查基因序列的读码框是否正确;
- c. 尝试将标签加在蛋白的另一端;
- d. 增加亲和凝胶与蛋白结合时间 (如 4°C 过夜);
- e. 如果使用预装柱, 可收集裂解液上柱后的穿流液并多次重复上柱;
- f. 检查所有缓冲液和溶液的 pH 值是否正确;
- g. 确认体系中所用各种试剂的浓度在镍柱的耐受范围以内;
- h. 自行配制裂解液, 降低裂解液中的咪唑浓度并设置梯度咪唑浓度进行净化。

## 6. 緩沖液配方

非變性裂解液:

50 mM PB, 0.3 M NaCl, 1%甘油, pH 8.0;

非變性洗滌液:

50 mM PB, 0.3 M NaCl, 1%甘油, 10 mM 咪唑, pH 8.0;

非變性洗脫液:

50 mM PB, 0.3 M NaCl, 1%甘油, 250mM 咪唑, pH 8.0;

變性裂解液:

50 mM PB, 0.3 M NaCl, 1%甘油, 8M Urea, pH 8.0;

變性洗滌液:

50 mM PB, 0.3 M NaCl, 1%甘油, 10 mM 咪唑, 8M Urea 或 6M 鹽酸胍, pH 8.0;

變性洗脫液:

50 mM PB, 0.3 M NaCl, 1%甘油, 250 mM 咪唑, 8M Urea 或 6M 鹽酸胍, pH 8.0;