

免费服务专线:4000-855-868 网站:www.mdbio.com.cn 电子邮件:mdbio@mdbio.com.cn

产品名称 & 产品编号

产品名称: His 标签蛋白纯化试剂盒

产品编号: HI021P-10ml

产品介绍

HisPur Ni-IDA Agarose Gel 是一种用于组氨酸 (His-tag) 标签蛋白纯化的亲和凝胶, 俗称镍柱。其将镍离子 (Ni^{2+}) 借助 IDA 等配基整合在琼脂糖凝胶微球表面, 通过亲水间隔臂降低空间位阻, 实现对 His 标签蛋白的高效识别。IDA 利用两个游离羧基将 Ni^{2+} 整合在琼脂糖微球表面, 可快速、高效的实现复杂样品体系中 His 标签蛋白的识别及分离。

通常带有 6 个及以上连续组氨酸标签的重组蛋白 (6×His-tagged recombinant protein) 被称为 His 标签蛋白。当蛋白样品溶液通过 HisPur Ni-IDA Agarose Gel 时, 重组蛋白上的标签组氨酸残基能被亲和凝胶特异性捕捉, 其它蛋白则不能被识别。洗涤后, His 标签蛋白可在非变性条件下或者变性条件下通过不同浓度竞争剂被解吸。该亲和凝胶可适用于细菌、哺乳动物细胞、昆虫及病毒等多种 His 标签表达系统中蛋白的纯化。纯化的蛋白可用于结构和功能研究、抗体制备、蛋白与蛋白相互作用、蛋白与核酸相互作用等方面的研究。该凝胶具有良好的稳定性、生物相容性及再生性能, 对 pH 环境及尿素、盐酸胍等变性剂有一定的耐受性, 既有利于保持生物样品活性并可以提高产品收率。

本产品已经整合了 Ni^{2+} , 呈蓝绿色, 储存在 20%乙醇溶液; 易于受到 EDTA/EGTA 等强螯合剂的影响造成 Ni^{2+} 离子流失 (<5 mM), 同时 DTT、 β -巯基乙醇等还原剂会在一定程度上还原的 Ni^{2+} , 因此蛋白样品或者纯化过程所使用的溶液限制使用还原剂和螯合剂。

镍柱耐受性 8 M 尿素, 6 M 盐酸胍 (吸附量略微降低影响不大, 但是盐酸胍 6M 溶液浓度太高, 容易析出盐酸胍晶体); EDTA 低于 2 mM, DTT、 β -巯基乙醇还原剂尽量不要有, 耐受性 0.01 mM。

指标名称	HisPur Ni-IDA Agarose Gel
配基	-IDA- Ni^{2+}
基质	4%交联琼脂糖微球
粒径	~ 75 μm
工作温度	4 - 40°C
pH 稳定性	4 - 10 稳定; 短时耐受 2 - 14

包裝清單

產品編碼	產品名稱	包裝
HI020	HisPur Ni-IDA Agarose Gel	10 mL
HI020-1	非變性裂解液	200 mL
HI020-2	非變性洗滌液	200 mL
HI020-3	非變性洗脫液	80 mL
HI020-7	溶菌酶	60 mL
HI020-8	亲和层析柱空柱管(3毫升)	10套
HI020-9	說明書	

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吸取備用。

使用步驟

1. 樣品準備

- 細菌中的目的蛋白誘導表達後，離心沉澱細菌。
- 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。
- 超聲或其它適當方法裂解細菌，離心取上清。
- 樣品溶液過 0.45 μm 微孔濾膜。為獲得亲和凝膠最佳吸附量，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，用裂解液平衡 3-4 次。

3. 样品纯化

- a. 细菌中的目的蛋白诱导表达后，离心沉淀细菌。
- b. 每克细菌沉淀湿重加入 4 mL 裂解液，可添加适量蛋白酶抑制剂，充分重悬细菌。
- c. 冰上超声裂解细菌，离心取上清。可以先使用溶菌酶处理，然后再进行超声处理。
- d. 将准备好的 4 mL 细菌裂解液上清上柱，并收集穿流液并重复上柱 3-5 次，以充分结合 His 标签蛋白。
- e. 用 0.5-1 mL 洗涤液洗柱 5 次。（如果出现咪唑浓度偏低的情况，可以自行添加适量咪唑，如果出现咪唑浓度偏高的情况，可以使用试剂盒提供的裂解液稀释洗涤液使用。）
- f. 用 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 2 min，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 250 mM 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-Na₂ 冲洗一次；
- 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 NiCl₂ 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. 常見問題

如果純化不成功，可對純化過程中收集的每個組分進行 SDS-PAGE 電泳檢測，從以下幾點分析原因：

- a. 蛋白無法與親和凝膠結合或蛋白出現降解；
- b. 測序檢查基因序列的讀碼框是否正確；
- c. 嘗試將標籤加在蛋白的另一端；
- d. 增加親和凝膠與蛋白結合時間（如 4°C 過夜）；
- e. 如果使用預裝柱，可收集裂解液上柱後的穿流液並多次重複上柱；
- f. 檢查所有緩衝液和溶液的 pH 值是否正確；
- g. 確認體系中所用各種試劑的濃度在鎳柱的耐受範圍以內；
- h. 自行配制裂解液，降低裂解液中的咪唑濃度並設置梯度咪唑濃度進行淨化。