

His标签蛋白纯化琼脂糖凝胶

Ni-Agarose Resin

本产品 4℃运输；保存于 4℃,禁止产品冻结,长期存放请保证试剂管竖立向上,保质期 24 个月。

货号规格

货号	规格
YJ104	1 mL×10

产品简介

本产品可以用于纯化各种表达系统融合表达的 His 重组蛋白，其是以高度交联的 4% 琼脂糖凝胶为基质,通过化学方法偶联三配位的亚氨基二乙酸 (IDA),并螯合镍离子 (Ni²⁺),形成比较稳定的平面四边形结构,从而有更多的位点与 His 标签上的咪唑环继续配位,达到结合目的蛋白的效果。

产品参数

项目	参数
基质	高度交联的 4% 琼脂糖微球
螯合物	Ni ²⁺
载量	> 40 mg 6×His 蛋白
粒径	45~165 μm
储存缓冲液	20% 乙醇
体积	10 mL(5 mL 凝胶)
耐压流速	80~150 cm/h (0.3 MPa, 3 bar)
浓度	凝胶体积占悬浮液体积的 50%
储存缓冲液	含 20% 乙醇的 1×PBS

自备试剂

缓冲液	推荐配方
平衡缓冲液	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, pH 8.0
漂洗缓冲液	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0
洗脱缓冲液	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0

注：所用去离子水和缓冲液在使用前建议用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤,减少杂质,以提高蛋白纯化效率和防止堵塞纯化柱。

操作步骤

样本处理 (以大肠杆菌表达系统为例)

1. 离心收集大肠杆菌 (4°C, 4,000×g, 30 min), 弃上清;
2. 用冷平衡缓冲液重悬细胞, 同时加入蛋白酶抑制剂 (货号: GRF101);
注: 所用试剂中不能含有 EDTA、EGTA 等螯合剂, DTT、巯基乙醇等还原剂, 尿素、盐酸胍等变性剂。
3. 用超声波破碎法在冰上破碎菌体, 直到样品破碎完全;
4. (可选) 如果裂解物太过粘稠, 可以加入 RNase A (终浓度 10 µg/mL) 和 DNase II (终浓度 5 µg/mL) 并在冰上孵育 10~15 min;
5. 离心收集上清 (4°C, 12,000×g, 20 min);
6. SDS-PAGE 分析 His 融合蛋白的含量及可溶性;

纯化重组 His 融合蛋白

7. 轻轻重悬 His 标签蛋白纯化琼脂糖凝胶, 吸取适量加入重力柱中, 用 5~10 倍柱体积的冷平衡缓冲液平衡 His 琼脂糖凝胶;
8. 将步骤 5 制备好的含有 His 融合蛋白的上清液加入到纯化柱中, 流速控制为 0.5~1 mL/min;
9. 蛋白上清液全部流出纯化柱后, 立刻加入漂洗缓冲液清洗纯化柱, 所需量大约为柱体积的 10~20 倍或者直到流出液的 A280 值达到最低且稳定;
10. 用 5~10 倍柱体积的现配洗脱缓冲液以 0.5~1 mL/min 的流速洗脱, 收集洗脱液。或者根据流出液 A280 值判断, 当数值陡然上升时开始接收洗脱液, 直到 A280 数值降至最低且稳定时, 停止收集。后续可根据目的蛋白的性质和用途, 4°C 透析到 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 或者 1×PBS, pH 7.4 中。

凝胶再生及储存

His 标签蛋白纯化琼脂糖凝胶可以重复使用, 但随着使用次数增多, 非特异性结合的蛋白聚集往往会造成流速和蛋白结合载量的下降, 此时便需要对琼脂糖凝胶填料进行清洗。

11. 使用 5 倍纯化柱体积去离子水清洗琼脂糖凝胶填料;
12. 使用 5 倍柱体积 100 mM EDTA (pH 8.0) 剥落镍离子;
13. 使用 10 倍柱体积去离子水清洗填料;
14. 使用 5 倍柱体积 0.5 M NaOH 清洗填料;
15. 使用 10 倍柱体积去离子水清洗填料;
16. 使用 3~5 倍柱体积 100 mM NiSO₄ 再生挂镍;
17. 使用 10 倍柱体积去离子水清洗, 即完成琼脂糖凝胶填料再生。

注: 填料再生后, 可以立即使用, 如不立即使用, 需要将填料悬浮于等体积的 20% 乙醇中, 置于 4°C 保存。

注意事项

1. 琼脂糖磁珠应保存在储存溶液中, 防止干燥;
2. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作;
3. 本产品仅限科研使用。



常见问题解析

问题描述	可能原因	解决方案
洗脱组分中没有目的蛋白	目的蛋白可能是包涵体, 上清无蛋白	可以通过电泳检测蛋白提取上清中是否含有目的蛋白, 包涵体蛋白需要按照相应纯化方式处理
	目的蛋白表达量太低	优化表达条件
	目的蛋白结合比较弱, 在漂洗步骤被洗脱丢失	提高漂洗缓冲液的 pH 值, 或者降低咪唑的浓度
	目的蛋白被蛋白酶降解	在裂解步骤或洗涤步骤加入适量的蛋白酶抑制剂
	目的蛋白不能有效地从琼脂糖凝胶填料上洗脱下来	降低洗脱缓冲液的 pH 值, 或者增加洗脱缓冲液中咪唑的浓度
		使用 10~100 mM EDTA 溶液剥离镍离子, 同时得到目的蛋白
回收的重组蛋白纯度不够	漂洗不彻底	增加漂洗缓冲液的用量
	样品中含有其它His标签蛋白	①通过调节 pH 值, 或者咪唑浓度来优化漂洗条件 ②通过使用其它纯化方式 (如离子交换, 疏水等) 进一步纯化洗脱组分
上样过程中蛋白发生沉淀	蛋白浓度太高	适当稀释蛋白
	操作温度太低	室温下进行上样
	蛋白发生聚集	在样品和所有的缓冲液中添加稳定剂, 如 0.1% 的 Triton X-100 或者 Tween-20