*仅用于实验室，不用于诊断。请随时跟我们索取并使用最新版本的说明书。

Ni-NTA His •Bind Resin 纯化树脂使用说明书

此品非常适合于满足大多数实验室级别小量纯化His-tag融合蛋白的需求。

目录号： **D-BN-002C（1ml）**
D-BN-005C（5ml）
D-BN-010 （20ml）
D-BN-050 （100ml）

操作手册

在您收到定购的产品时，请确认操作手册是配套的！
同时，有改进的地方还请各位老师批评指正！
反馈信箱：tech@aderr.com

2011年10月，第1版

艾德科技(北京)有限公司
A&D Technology Corporation

产品简介

Ni-NTA His • Bind Resin 纯化树脂是偶联了 **IDA** 或者 **NTA** 的交联琼脂糖，性质稳定、重复性好、使用简单、方便。胶粒平均直径 **100** 微米，比表面积大，结合大肠杆菌重组 **His-tag** 融合蛋白的能力大于 **20mg/ml(30kDa)**。可以满足大多数实验室级别小量纯化 **His-tag** 融合蛋白的需求。

树脂种类	结合基团	螯合金属	亲和力（载量）	特异性
Sepharose-IDA	IDA	Ni2+	高（40mg/ml）	低
Sepharose-IDA	IDA	Co2+	中等(30mg/ml)	中等
Sepharose-NTA	NTA	Ni2+	中等(25mg/ml)	中等
Sepharose-NTA	NTA	Co2+	低(20mg/ml)	高

贮藏条件：

20%乙醇保存；常温运输；4℃保存，一年有效。

操作手册：

1. 纯化过程中用到的缓冲液（用户自己设置）：

1.1 破菌缓冲液： **1L 体积**

Tris	**20mM(6M HC1 调 pH 值到 7.4)**	**2.42g**
NaCl	**250mM**	**14.6g**
PMSF	**1mM**	**10mL 100X 储液**

100X PMSF 储液（**1.74g PMSF** 溶解于 **100mL** 异丙醇），**-20**℃长期保存，**4**℃保存数月，禁止室温存放。

1.2 上样缓冲液：同破菌缓冲液，可以不加 **PMSF**

1.3 洗杂缓冲液：在上样缓冲液中添加咪唑至 **20mM**

1.4 洗脱缓冲液：在上样缓冲液中添加咪唑至 **200mM**

注：上述缓冲液为起始缓冲液，目的蛋白质不同，可能需要不同的纯化缓冲液。具体使用可以参考分子克隆等工具书或者文献对缓冲液做修改。也可以根据蛋白质性质对上述缓冲液做修改，例如：目的蛋白质在 **pH7.4** 下不稳定，可以在 **pH7.3-8.3** 的范围内对缓冲液的 **pH** 调整；**200mM** 咪唑未洗脱下目的蛋白质，可以继续提高咪唑浓度；洗杂蛋白时候目的蛋白质也洗脱，洗杂缓冲液中咪唑浓度降低或者不添加；一些情况下，缓冲液在中添加 **5%-10%**的甘油，**0.1%**的 **tween, 0.5M** 的 **NaCl** 会提高蛋白质纯化的效果。

2.蛋白纯化步骤：

2.1 离心收集 **500ml** 表达目标蛋白的大肠杆菌，冻融或超生破菌于 **20ml** 破菌缓冲液。这一步可以适当加

入 **PMSF** 作为蛋白酶抑制剂，但是不能使用 **EDTA**。还原剂使用 **2mM 2-ME**，避免使用 **DTT**，因为 **DTT** 会造成 **Ni/Co** 离子还原。

2.2 离心取上清，上样于预先平衡好的纯化柱（**10** 倍珠体积上样缓冲液平衡），通常自然流速可以很好结合。少数情况下，流速过慢，可以使用硅胶管控制上样速度。

2.3 样品上完以后，使用上样缓冲液洗柱 **10** 个柱体积，注意将纯化柱侧壁上的残留样品洗干净。

2.4 使用 **10-20** 倍柱体积洗杂缓冲液将杂蛋白从纯化柱上洗去，如果杂蛋白太多可以加大洗杂体积。

2.5 洗杂结束以后，使用 **4-10** 倍柱体积洗脱缓冲液将目标蛋白洗脱。通常目标蛋白会在第二个柱体积中开始流出。

2.6 收集完成以后，使用 **8M** 尿素或者 **6M** 盐酸胍 **5** 倍柱体积洗柱，再使用大量蒸馏水水洗柱，封闭纯化管上下两端保存在 **4**℃，不要再-**20**℃冻结。如果长期不用，加入 **5ml 20%**乙醇封闭保存。

处理与再生：

His • Bind Resin 可以多次使用，不需要再生。如果需要使用一根柱子纯化不同目标蛋白，或者长时间使用造成金属离子脱落，柱子堵塞、流速慢，可以按照下述方法进行再生。

1. 用 **0.1M EDTA** 洗柱 **4** 倍柱体积，将金属离子洗脱下来，再用蒸馏水洗柱 **10** 倍柱体积除去 **EDTA** 残留。如果柱子堵塞严重，使用 **1%Triton X-100/PBS** 浸泡过夜。
2. 使用 **0.1M** 盐酸洗柱 **4** 倍柱体积，**10** 倍柱体积蒸馏水冲洗，再用 **0.1M** 氢氧化钠洗柱 **4** 倍柱体积，**PBS/TBS** 平衡 **pH**，大量蒸馏水洗柱。这一步需要避免强酸、强碱洗柱时间过长。
3. 用 **4%**氯化镍或者硫酸镍 **3** 倍柱体积重新螯合 **10** 分钟，也可以使用 **4%**氯化钴或者硫酸钴螯合柱子。
4. 柱子长时间不用，加入 **20%**乙醇，封口后于 **4** 摄氏度保存，避免干裂或者冻结。

补充说明：

1. 在未知 **Ni-NTA His • Bind Resin** 融合蛋白稳定性的情况下，整个纯化过程最好在 **4**℃完成，可以使用蛋白酶抑制剂防止降解，但是 **EDTA** 应当在纯化完成以后再加入。此外，可以使用非离子去垢剂改善结合，具体使用浓度参考以下：**1% Triton X-100** ，**1% Tween-20**，**0.03%SDS**，**0.1% NP-40.**
2. 最好不同的融合蛋白使用不同的柱子，没跟 **1ml** 的 **His •Bind Resin** 亲和柱一次可以结合大约 **20mg His-Tag** 融合蛋白，样品较多，可以使用多根柱子。
3. 上样缓冲液中可以含有 **1mM** 咪唑减少杂蛋白的结合，部分目标蛋白会在 **20mM** 咪唑洗杂缓冲液中流出，所以对于新样品，每一步都要留样电泳，摸索纯化条件。
4. 如果融合蛋白是包涵体形式，那么可以选择变性纯化方法，通常是在缓冲液中加入 **8M** 尿素以及去垢剂。变性纯化时一定要做好样品处理，不然容易造成柱子堵塞。变性方法得到的蛋白一般没有活力，可以用来制备抗体，但如想测定活力，就需要复性。
5. 除了常规的咪唑洗脱方法以外，还有 **EDTA** 洗脱和 **pH** 梯度洗脱。后两种方法缺点明显，只在特殊情况下使用。
6. 可以使用在柱酶切的方法得到去除 **His-Tag** 的目标蛋白。经常使用的酶包括：**Thrombin**；**Enterokinase**；**TEV protease** 等。我们推荐 **TEV protease**(货号：**RPP002**)，因为这种酶的特异性较好，是带有 **Ni-NTA His • Bind Resin** 的重组酶，方便除去。在柱酶切可以提高产物纯度，但是空间位阻可能造成酶切效果不好，按照惯例，多数实验不用切除 **Ni-NTA His • Bind Resin**。

附录

凝难解答

His • Bind Resin 亲和柱使用简单，但是操作失误，也会遇到问题。常见的问题列在下表中，供参考。

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
纯化不到 His-tag 融合蛋白	金属离子脱落，柱子失去颜色或者变色	确证破菌缓冲液中不含有 EDTA、EGTA、柠檬酸、DTT 等螯合剂；重新处理柱子，为了 His-Binding-resin 螯合金属离子。
	融合蛋白是包涵体	降低表达温度（16-22℃），降低 IPTG 诱导浓度（10—100μM），缩短诱导时间（2-5 小时）；做包涵体复性，或者使用变性纯化。
	表达量太低	换载体或者优化密码子序列。
	融合蛋白不结合	测序检查核酸序列，将 tag 从一端移动到另一端，增加接头序列
	纯化的蛋白没有活性	调整破军条件，超声产生的热量可能使 GST 蛋白变性。
	融合蛋白被蛋白酶降解	在破菌缓冲液中加入蛋白酶抑制剂，缩短纯化时间，降低温度。
	融合蛋白不能从柱子上洗脱	加入 0.1%TritonX-100；增加 NaCl 浓度；使用变性纯化。
洗脱的目标蛋白有大量杂带	融合蛋白被蛋白酶降解	在破菌缓冲液中加入蛋白酶抑制剂，缩短纯化时间，降低温度。
	有些宿主细胞的分子伴侣蛋白会与融合蛋白结合	上样前加入 5mM DTT，或者使用 10mM $MgSO_4$ 50mM Tris， 2mM ATP 先反应 20 分钟，让伴侣蛋白去结合。
	超声裂菌过度，目标蛋白被打断	注意超声仪的工作功率以及超声时间，使用显微镜控制裂菌。
	金属离子亲和柱非常容易产生非特异性吸附，特别是在目标蛋白表达量较低时	在上样缓冲液中加入去垢剂，可以有多种选择；加入目标蛋白上样量；减少 bead 使用量；加大盐离子浓度；咪唑梯度洗脱；变性纯化等等。

相关产品：

1、 其他亲和纯化柱：**GST**、**ProteinA\G**、**blue** 柱等；
2、 去除标签的蛋白酶：推荐 **TEV protease**(货号：**RPP002**)
3、 标签抗体： **His tag**、**HA tag**、**Flag tag**、**Myc tag**、**SUMO tag** 等
4、 **ECL** 显色液

定购信息

货号	产品描述	规格
D-BN-002C	1mL 预装柱（等于 2ml 50%悬液）	1 ml
D-BN-005C	5ml 预装柱（等于 10ml 50%悬液）	5 ml
D-BN-010	20ml (50% 悬液)	20 ml
D-BN-050	100ml（50%悬液）	50 ml
D-BN-X	>500ml	500 ml

推荐产品

DNA 样本的制备:

货号	品名
A-D1801	全基因组 DNA 极速提取试剂盒（离心柱）
A-D1901	细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱）
A-D3111	新型极速植物基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱）
A-D6201	酵母基因组 DNA 试剂盒（离心柱）
A-D7111	石蜡包埋组织基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱）

全基因组DNA甲基化定量试剂盒:

货号	品名
A-P-1026	DNA 甲基化极速修饰试剂盒
A-P-1028	快速 MS-qPCR 试剂盒
A-P-1029	Epiquick qPCR 快速试剂盒
A-P-1034	DNA 甲基化定量检测试剂盒(比色法)
A-P-1035	DNA 甲基化定量检测试剂盒(荧光法)
A-P-1036	DNA 羟甲基化定量检测试剂盒(比色法)
A-P-1037	DNA 羟甲基化定量检测试剂盒(荧光法)

其它产品：

货号	品名
A-R1201	A&D TRIpure 高纯总 RNA 快速提取试剂盒（离心柱型）
A-R4001	A&D 血液总 RNA 快速提取试剂盒（液体样本,离心柱型）
A-R3301	A&D 通用植物总 RNA 提取试剂盒（离心柱型）
A-R5901	A&D血液（液体样本）microRNA快速提取试剂盒（柱型）
A-R5311	A&D 石蜡包埋组织 microRNA 快速提取试剂盒（柱型）

如何下单

1. 电话，传真或邮件定购:

电话：010－52406250；传真：010－52406250；

邮件： ordering@aderr.com

2. 在线定单定购:

http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1771&t=1474

推荐阅读

1. “新四大碱基”的确定，对于生物学研究者的几点启示!

http://www.aderr.com/cn/main.php?m=2566&t=3623&id=21290

2. 科学家发现新型 DNA-microDNA！

http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1349&t=3606&id=20763

3. 艾德科技为您提供“一站式”的产品与服务！

http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1349&t=3606&id=20739

4. RNA 甲基化修饰和定量？惊呆了我和小伙伴们！！！--new

http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1349&t=3606&id=30829

艾德科技（北京）有限公司
A&D Technology Corporation

地 址：北京昌平区中关村生命科学园东 60 米（102206)
电 话：010-52406250 传真：010-52406250
网 址：www.aderr.com Email:tech@aderr.com