上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话：021-61312973　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：shyysw@sina.com

HisSep Ni-NTA Agarose Resin(His标签蛋白琼脂糖纯化树脂)

简介：

HisSep Ni-NTA Agarose Resin以交联的6%琼脂糖凝胶为基质，通过化学方法偶联四配位的氮川三乙酸（NTA）为配体，螯合镍离子（Ni2+）后，形成非常稳定的八面体结构，镍离子处于八面体的中心，这样的结构可保护镍离子免受小分子的进攻，更加稳定，可以耐受一定浓度的还原剂、变性剂或耦合剂等苛刻条件。已经成为实验室纯化His标签蛋白不可或缺的树脂之一。

产品性质：

基质(Matrix)	交联的6%琼脂糖凝胶
粒径(Bead size)	45-165μm
载量(Capacity)	>40 mg6×His-tagged protein/mL基质
耐压(Tolerance Pressurema)	0.1 MPa,1 bar
储存缓冲液(Buffer)	含20%乙醇的1×PBS

储存条件：2~8℃保存，有效期 2 年

使用说明：

1. 纯化流程

1）缓冲液的准备

缓冲液使用原理：低咪唑上样，高咪唑洗脱，或者高 pH 上样，低 pH 洗脱。Buffer 在使用前最好用 0.22 μm 或 0.45 μm滤膜过滤除菌。HisSep Ni-NTA Agarose Resin 可以用于可溶性蛋白和包涵体蛋白的纯化，可溶性组氨酸标签蛋白纯化所需配方详见附表 1。包涵体组氨酸标签蛋白纯化所需缓冲液及配方详见附表 2。

2）样品准备

a. 细菌表达的蛋白（本说明以细菌表达蛋白为例）

a）挑取单菌落到含有适合抗性的 LB 培养基中，根据载体说明加入相应的诱导剂诱导相应的时间。

b）表达结束后，将培养液转至离心瓶，7000 rpm，离心 15 min，收集菌体，然后加入 1/10 体积的裂解液（Lysis buffer）和 PMSF（PMSF 在破碎前加入，其终浓度为 1 mM），同时也可加入其他蛋白酶抑制剂（如蛋白酶抑制剂 Cocktail（用于 His-Tag 蛋白纯化）, EDTA-free, 100×DMSO 储液，，但不能影响目的蛋白与树脂的结合。

c）之后加入溶菌酶，使其工作浓度为 1 mg/mL。【注】如果表达的宿主细胞内含 pLysS 或 pLysE，可以不加入溶菌酶。

d）将菌体沉淀悬浮起来（如果菌液浓度高，可考虑加入 10 μg/mL RNase A 和 5 μg/mL DNase I），混匀，置于冰上超声破碎细胞，至菌液基本保持澄清。

e）收集上述澄清蛋白液，10000 rpm，4℃离心 20-30 min。取上清，0.22 μm/0.45 μm 滤膜过滤后，置于冰上备用或-20℃保存。

b. 酵母、昆虫和哺乳细胞分泌表达的可溶性蛋白

将细胞培养液转移至离心瓶，5000 rpm 离心 10 min，收集上清。如上清中不含 EDTA、组氨酸和还原剂等，即可直接上柱纯化；如含有 EDTA、组氨酸和还原剂等物质，则需用 1×PBS 4℃下透析后方可上柱。

【注】对于大量体积的上清，需加入硫酸铵进行沉淀浓缩，之后经 1×PBS 4℃下透析后上柱。

c. 包涵体蛋白纯化（以细菌为例，变性条件）

a）将培养液转移至离心瓶，7000 rpm，离心 15min，收集菌体去上清。

b）按照菌体：裂解液（不含 8 M 尿素）=1:10（w/v）的比例将菌体充分悬浮，混匀，冰浴超声破碎。

c）将破碎液转移至离心管，10000 rpm，4℃离心 20-30min，去上清。可重复步骤 b）和 c）一次。

d）按照菌体：裂解液（含 8 M 尿素）=1:10（w/v）的比例将包涵体充分悬浮。

e）变性条件下纯化 His 标签蛋白。

3）HisSep Ni-NTA Agarose Resin 重力柱的装填

a) 取合适规格的重力层析柱，装入下垫片，加入适量纯水润洗柱管和垫片，关闭下出口。

b) 将 HisSep Ni-NTA Agarose Resin 混合均匀，用枪头吸取适量浆液加入重力柱中（填料实际体积占悬液的一半），打开下出口流干保护液。

c) 加入适量纯水冲洗填料，待柱管中液体重力流干后，关闭下出口。

d) 加入润洗后的上垫片，确保垫片与填料之间没有空隙，且保持水平。

e) 装填好的重力柱可以直接加入平衡液进行平衡，暂不使用时则加入保护液，4℃保存。

4）样品纯化

a. 孵育法纯化

a) 根据纯化的样品量，取适量 HisSep Ni-NTA Agarose Resin 加入离心管中，1000 rpm 离心 1 min, 吸弃上清；也可加入重力柱中，流干保护液。

b) 向离心管中加入 5 倍介质体积的 Lysis Buffer 清洗填料，1000 rpm 离心 1 min，吸弃上清；如使用重力柱，则直接在重力柱中清洗，直接重力流干 Lysis Buffer；重复两次以上。

c) 加入样品，封闭离心管或重力柱管，4℃振荡孵育 2~4 h 或者 37℃孵育 30 min~2 h。

d) 孵育结束后，1000 rpm 离心 1 min，吸弃上清，或过滤收集填料，上清保留作为流穿，用于电泳鉴定。

e) 用 5 倍填料体积的 Wash Buffer 清洗填料，1000 rpm 离心 1min 或重力柱管过滤，去除上清（注意不要吸到填料），重复 3-5 次，中间建议更换新离心管。必要时可以调整咪唑的浓度进行洗杂。

f) 加入 3-5 倍柱体积的 Elution Buffer 进行洗脱，室温孵育 10-15 min，1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管收集洗脱液，可重复 2-3 次。

b. 重力柱法纯化

a）将装填好 HisSep Ni-NTA Agarose Resin 的重力柱用 5 倍柱体积 Lysis Buffer 进行平衡，使填料处于与目的蛋白相同的缓冲液体系下，重复 2-3 次。

b）将样品加到平衡好的重力柱中，样品保留时间至少 2 min，保证样品和填料充分接触，收集流出液，可以反复上样增加结合效率。

c）用 10-15 倍柱体积的 Wash Buffer 进行洗杂，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液。必要时可以调整咪唑的浓度进行洗杂。

d）用 5-10 倍柱体积的 Elution Buffer 洗脱，分段收集，每一个柱体积收集一管，分别检测，既可以保证所有结合的目的蛋白被洗脱，又可以得到高纯度和高浓度的蛋白。

e）随后依次用 3 倍柱体积的 Lysis Buffer 和 5 倍柱体积的去离子水清洗填料。5 倍柱体积的 20%乙醇平衡填料，最后将填料保存在 20%乙醇的 1×PBS 中，置于 4℃保存。

5）SDS-PAGE 检测

将纯化过程中得到的样品（包括原始样品、流出组分、洗杂及洗脱组分等）利用 SDS-PAGE 进行检测，判定其纯化效果。

2. 在位清洗

当填料使用过程中发现反压过高（＞0.5 MPa）或者填料上面出现明显的污染时，需对其进行在位清洗（Cleaning-in-Place，CIP）。建议按照下面操作去除填料上残留的污染物，如沉淀蛋白、疏水蛋白和脂蛋白等。

1) 去除强疏水结合的蛋白，脂蛋白和脂类

使用 30%异丙醇清洗 5-10 个柱体积，接触时间为 15-20 min 可以去除此类污染物。之后再用去离子水清洗 10 倍柱体积。也可以选择使用含有去污剂的酸性或者碱性溶液，清洗填料 2 倍柱体积。例如含有 0.1-0.5%非离子去污剂的 0.1 M 醋酸溶液，接触时间为 1-2 h。去污剂处理后，需用 70%的乙醇清洗 5 倍柱体积，彻底去除去污剂。最后使用去离子水清洗 10 倍

柱体积。

2) 去除离子作用结合的蛋白

使用 1.5 M NaCl 溶液接触 10-15 min，之后用去离子水清洗 10 倍柱体积。

3. 填料再生

His 标签蛋白亲和纯化填料所带的镍离子不需要经常螯合去除和重新挂镍离子。当填料使用过程中发现反压过高（＞0.5MPa），颜色变浅，或填料载量明显变低时，需要对其进行镍离子剥离及重新挂镍处理，即填料再生。按照下面操作流程进行：

a）使用 5 倍柱体积去离子水清洗填料；

b）使用 5 倍柱体积 100 mM EDTA（pH 8.0）剥落镍离子；

c）使用 10 倍柱体积去离子水清洗填料；

d）使用 0.5 M NaOH 清洗 5 倍柱体积，停留 10-15 min；

e）使用去离子水清洗填料，直至 pH 中性；

f）使用 3-5 倍柱体积 100 mM NiSO4再生挂镍；

g）使用 10 倍柱体积去离子水清洗。

填料再生后，可立即使用，也可保存在 20%乙醇中，置于 4℃备用。

注意事项

1. 本产品仅作科研用途。

2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。

附表1 可溶性His标签蛋白纯化所需缓冲液及配方

缓冲液名称	配方	配制1L溶液所需各种试剂量
Lysis Buffer(pH8.0)	50 mM NaH_2PO_4 300 mM NaCl 10 mM imidazole NaOH调pH至8.0,0.22 μm或0.45μm过滤除菌	$NaH_2PO4 \cdot 2H_2O$ 7.8g NaCl 17.54g Imidazole 0.68g
Wash Buffer(pH8.0)	50 mM NaH_2PO4 300 mM NaCl 20 mM imidazole NaOH调pH至8.0,0.22 μm或0.45μm过滤除菌	$NaH_2PO4 \cdot 2H_2O$ 7.8g NaCI 17.54g Imidazole 1.36g

Elution Buffer(pH8.0)	50mM NaH_2PO4 300 mM NaCl 250 mM midazole NaOH调pH至8.0,0.22μm或0.45μm过滤除菌	$NaH_2PO4 \cdot 2H_2O$ 7.8g NaCl 17.54g Imidazole 17.0g

附表2 包涵体His标签蛋白纯化所需缓冲液及配方

缓冲液名称	配方	配制1L溶液所需各种试剂量
Lysis Buffer(pH8.0)	8M Urea 100 mM NaH_2PO4 100 mM Tris·HCl 盐酸溶液调pH至8.0,0.22μm或0.45μm过滤除菌	Urea 480.5 g $NaH_2PO4 \cdot 2H_2O$ 15.6 g Tris·HCI 15.76g
Wash Buffer(pH6.3)	8M Urea 100 mM NaH_2PO_4 100 mM Tris·HCl 盐酸溶液调pH至6.3,0.22 μm或0.45μm过滤除菌	Urea 480.5g $NaH_2PO4 \cdot 2H_2O$ 15.6g Tris·HCI 15.76 g
Elution Buffer(pH4.5)	8M Urea 100 mM NaH_2PO4 100 mM Tris·HCl 盐酸溶液调pH至4.5,0.22μm或0.45μm过滤除菌	Urea 480.5 g $NaH_2PO4 \cdot 2H_2O$ 15.6 g Tris·HCI 15.76g

附表3 HisSep Ni-NTA Agarose Resin 试剂耐受情况

试剂种类	浓度
还原剂	5 mM DTE 0.5-1 mM DTT 20 mMβ-mercaptoethanol 5 mM TCEP 10 mM reduced glutathione
变性剂	8M urea 6M Gua-HCl
去污剂	2%TritonX-100(nonionic ） 2%Tween20(nonionic） 2%NP-40(nonionic) 2%Cholate(anionic) 1%CHAPS (zwitterionic)

其他类	500 mM imidazole 20%ethanol 50%glycerol 100 mM Na_2SO_4 1.5M NaCl 1mM EDTA 60 mM citrate
缓冲液	50 mM sodium phosphate,pH7.4 100 mM Tris-HCl,pH7.4 100 mM Tris-acetate,pH7.4 100 mM HEPES,pH7.4 100 mM MOPS,pH7.4 100 mM sodium acetate,pH7.4

附表4 问题及解决方案

问题	可能原因	推荐解决方案
柱子反压过高	填料被堵塞	裂解液中可能含微小的固体颗粒，建议上柱前使用滤膜(0.22 μm或0.45μm) 过滤，或离心去除。
		样品中含高浓度的核酸，延长破碎时间直至粘度降低，或添加DNaseI(终浓度 为5μg/mL),Mg^{2+}(终浓度 1mM),冰上孵育10-15min
	样品太黏稠	有机试剂或蛋白稳定试剂(如甘油等)可能会引起反压增高，降低操作流速。
洗脱组分中无目的蛋白	蛋白可能是包涵体	可通过电泳检测裂解液，分析上清中是否有目的蛋白，包涵体蛋白需按照包涵体 蛋白的纯化方式
	表达量太低	优化表达条件，使用包涵体纯化缓冲体系
	目的蛋白结合比较弱，在洗杂步骤中已被洗 下来	提高Wash Buffer的pH值，或者降低咪唑浓度
	目的蛋白结合过强，不容易洗脱下来	降低Elution Buffer的pH,或者增加Elution Buffer中的咪唑浓度
		使用10-100mM EDTA溶液剥离镍离子，同时得到蛋白
	蛋白降解	菌体破碎时需添加一些蛋白酶抑制剂
		在4℃下进行纯化操作
洗脱组分不纯(含多种蛋白)	洗杂不彻底	增加Wash Buffer体积
	样品中含有其他His标签蛋白	通过调节pH值或咪唑浓度来优化洗杂条件。再使用其他纯化手段(如去离子交 换，疏水等)进一步纯化洗脱组分。
填料颜色变浅或变成白色	镍离子脱落或者剥离	按照填料再生的操作重新挂镍离子
填料呈现褐色	缓冲液中含有DTT等还原剂	参考附3适当降低还原剂DTT的浓度，或改用巯基乙醇
	操作温度太低	室温下进行上样

上样过程中蛋白发生沉淀	蛋白发生聚集	在样品和所有缓冲液中添加稳定剂，如0.1% TritonX-100或Tween-20