

公司产品仅供科学研究使用、不得用于临床诊断！

商品属性：

产品名称	规格	货号
His标签纯化树脂 (Ni-NTA Resin)	20 ml (50%浆体)	A-PJ1101

描述：

Ni-NTA Resin 是用于纯化 6×His 标签重组蛋白的一种纯化介质，它是由 4%交联的 Sepharose 耦连了一种四齿螯合剂 NTA 而得。它可用于在非变性或变性条件下纯化任何表达系统表达的 6×His 标签重组蛋白。NTA，含有四个螯合区，较一般的三齿螯合剂能更好的结合 Ni²⁺。6×His 可与 Ni²⁺螯合，从而使 His 标签蛋白结合在 Ni-NTA 纯化介质上，未结合的蛋白被洗涤下去，结合在介质上的蛋白经过一定浓度的咪唑或低 PH 缓冲液被温和的洗脱下来，从而得到高纯度的目的蛋白。

主要特征

该纯化介质与 His 标签蛋白具有极高的亲和力，可达5-20 mg/ml。

可在非变性和变性条件下纯化任何表达系统所得的 His标签蛋白。

纯化程序简单，所得的蛋白纯度可高达 95%。

Ni-NTA 可再生 4-6 次，重复使用。

组成：50%的悬浮液（20%乙醇），已螯合 Ni²⁺。

应用

His 标签蛋白的纯化。

蛋白结构与功能研究。

蛋白-蛋白以及蛋白-DNA 之间相互作用的研究。

配体-受体之间相互作用的研究。

储存：4℃保存，可保存 2 年。

操作方法

A. 非变性条件下抽提 His 标签蛋白

1. 样品准备

1) 准备细胞，接种，诱导表达。对于实验室用的 pET 载体表达系列，在细胞 OD₆₀₀=0.5-0.8 时，用 1 mM IPTG 诱导 1-3 小时，可以获得理想的表达效率。收集细胞，置于-70℃或立即进行步骤 2 操作。

2) 加入 1/20 细胞生长体积的 NTA-0 Buffer (20 mMTris-HCl pH7.9, 0.5 M NaCl, 10% Glycerol)和 1 mM PMSF。

注意：PMSF 见水分解，需要在使用前加入。

3) 将细胞悬浮起来，超声或匀浆破碎细胞。该步骤冰上操作。

4) 加入 10% Triton X-100, 使终浓度为 0.05%，充分混匀，冰上放置 15 分钟。

5) 13,000 转/分(20,000xg 以上)，4℃ 离心 15min。取上清，置于冰上备用或-20℃ 保存。

2. 层析

1) 将 NTA 树脂装入合适的层析柱，层析用 10 倍 NTA 体积的 NTA-0 Buffer 平衡填料。

2) 将上清样品加至 NTA 层析柱中，流速在 15 ml/h 左右，收集穿透部分，用于 SDS/PAGE 分析蛋白质的结合情况。

3) 层析用 5 倍 NTA 体积的 NTA-0 Buffer 洗涤填料，流速控制在 30 ml/h 左右。

4) 再分别用 5 倍 NTA 体积的 NTA-20、NTA-50、NTA-100、NTA-250 洗脱填料，流速控制在 15 ml/h 左右，收集洗脱液，每管收集一个 NTA 体积。

5) 确定目标蛋白质在洗脱液中的分布情况。最为有效的方式是 SDS/PAGE 分析。也可以用 Bradford 蛋白质测定试剂盒，快速确定蛋白质的含量，然后用 SDS/PAGE 分析蛋白质的分布。

6) 目标蛋白质需要进一步纯化需要根据蛋白质的用途确定。纯化的目标蛋白质的保存条件需要根据蛋白质的性质和用途确定。

3. 溶液配方

NTA-0 Buffer:

20 mM Tris-HCl pH7.9, 0.5 M NaCl, 10% Glycerol,

NTA-20 Buffer:

20 mM Tris-HCl pH7.9, 0.5 M NaCl, 10% Glycerol,

20 mM Imidazole(咪唑)

NTA-50 Buffer:

20 mM Tris-HCl pH7.9, 0.5 M NaCl, 10% Glycerol,

www.affandi-e.com