



Ni-NTA 树脂使用说明书

非变性条件下抽提 His Tag 蛋白质

下列方法适用于从细菌中抽提通常含有连续 6 个组氨酸尾 (His Tag Protein) 的具有天然结构的可溶性重组蛋白质 (Native Protein)。其他来源的蛋白质样品，如果目标蛋白质具有 His Tag 结构，提供的层析方法可供参考。

一、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 1mM 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 度或立即进行步骤 2 操作。
- 2) 加入 1/20 细胞生长体积的 NTA-0 Buffer (20mM Tris-HCl pH7.9, 0.5M NaCl, 10% Glycerol) 和 PMSF。PMSF 用无水乙醇配制成 200mM 储存液，-20 度或 4 度保存；PMSF 使用的工作浓度位 1mM；注意：PMSF 见水分解，需要在使用前加入。该步骤冰上操作。
- 3) 将细胞悬浮起来，加入溶菌酶 (工作浓度位 0.2-0.4mg/ml，如果表达的宿主细胞内含 pLysS 或 pLysE，可以不加溶菌酶)，混匀，冰上放置 30 分钟，超声或匀浆破碎细胞。该步骤冰上操作。
- 4) 加入 10% Triton X-100，使 Triton 的终浓度为 0.05%，充分混匀，冰上放置 15 分钟，间或混匀)；冰上超声破碎细胞，同时降低粘稠度。
- 5) 加入 1M MgCl₂，使 MgCl₂的终浓度为 1mM，混匀。加入 DNase，使 DNase 的终浓度为 10 g/ml，混匀，室温放置 10 分钟。
- 6) 15000 转/分 (20,000xg 以上)，4 度离心 15 分钟以上。取上清，置于冰上备用或-20 度保存。

二、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 洗。
- 2) 将样品 (步骤 2 (6)) 加到 NTA 层析柱中，流速控制在 15ml/小时左右，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，流速控制在 30ml/小时左右。
- 4) 分别用 5 倍 NTA 体积的 NTA-20, NTA-40, NTA-60, NTA-80, NTA-100, NTA-200, NTA-1000 Buffer 洗脱，流速控制在 15ml/小时左右，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。

三、附件：溶液配方

NTA-0 Buffer:

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

NTA-20 Buffer:

20mM Tris-HCl pH7.9, 0.5M NaCl, 10% Glycerol, 20mM Imidazole(咪唑)

NTA-40 Buffer:

20mM Tris-HCl pH7.9, 0.5M NaCl, 10% Glycerol, 40mM Imidazole(咪唑)

NTA-60 Buffer:

20mM Tris-HCl pH7.9, 0.5M NaCl, 10% Glycerol, 60mM Imidazole(咪唑)



NTA-80Buffer:

20mM Tris-HCl pH7.9, 0.5M NaCl, 10% Glycerol, 80mM Imidazole(咪唑)

NTA-100Buffer:

20mM Tris-HCl pH7.9, 0.5M NaCl, 10% Glycerol, 100mM Imidazole(咪唑)

NTA-200Buffer:

20mM Tris-HCl pH7.9, 0.5M NaCl, 10% Glycerol, 200mM Imidazole(咪唑)

NTA-1000 Buffer:

20mM Tris-HCl pH7.9, 0.5M NaCl, 10% Glycerol, 1000mM Imidazole (咪唑)

变性条件下从包涵体中纯化 His Tag 的蛋白质

有些蛋白质细菌或其他细胞中表达效率很高, 但溶解性很差, 通常形成包涵体。这些蛋白质的溶解通常需要用盐酸胍或尿素。与 MBP 和 GST 的亲和层析材料相比, NTA 树脂可以在 6M 的盐酸胍存在的情况下与具有 His Tag 的蛋白质结合。整个层析过程都是在有盐酸胍的条件下进行。纯化后的蛋白质需要进行复性, 正确复性的蛋白质才具有生物学活性。

下列方法(步骤 4-5)用于从细菌中抽提含 His Tag 位于包涵体变性蛋白质。

一、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 1mM 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 度或立即进行步骤 2 操作。
- 2) 加入 1/20 细胞生长体积的 GuNTA-0 Buffer (20mM Tris-HCl pH7.9, 0.5M NaCl, 10% Glycerol, 6M Guanidium HCl) 和 PMSF。PMSF 用无水乙醇配制成 200mM 储存液, -20 度或 4 度保存; PMSF 使用的工作浓度位 1mM; 注意: PMSF 见水分解, 需要在使用前加入。
- 3) 将细胞悬浮起来, 冰上超声破碎细胞, 降低粘稠度。
- 4) 室温放置 30 分钟, 间或混匀或用磁力搅拌。
- 5) 15000 转/分 (20,000xg 以上), 4 度离心 15 分钟以上。取上清, 置于冰上备用或-20 度保存。

二、层析

- 1) 将 NTA 树脂装入合适的层析柱, 层析用 10 倍 NTA 体积的 GuNTA-0 Buffer 洗。
- 2) 将样品(步骤 2 (5))加到 NTA 层析柱中, 流速控制在 15ml/小时左右, 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 GuNTA-0 Buffer 洗, 流速控制在 30ml/小时左右。
- 4) 分别用 5 倍 NTA 体积 GuNTA-20, GuNTA-40, GuNTA-60, GuNTA-100, GuNTA-500 洗脱, 流速控制在 15ml/小时左右, 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。
- 7) 纯化的目标蛋白质需要复性, 复性常用的手段可以参考有关手册确定的原则, 根据蛋白质的特性来摸索具体的方案。

三、附件: (溶液配方)

GuNTA-0 Buffer:

20mM Tris-HCl pH7.9, 0.5M NaCl, 10% Glycerol, 6M Guanidium HCl

GuNTA-20 Buffer:

20mM Tris-HCl pH7.9, 0.5M NaCl, 10% Glycerol, 6M Guanidium HCl, 20mM Imidazole

GuNTA-40 Buffer:

20mM Tris-HCl pH7.9, 0.5M NaCl, 10% Glycerol, 6M Guanidium HCl, 40mM Imidazole
GuNTA-60Buffer:

20mM Tris-HCl pH7.9, 0.5M NaCl, 10% Glycerol, 6M Guanidium HCl, 60mM Imidazole
GuNTA-100Buffer:

20mM Tris-HCl pH7.9, 0.5M NaCl, 10% Glycerol, 6M Guanidium HCl, 100mM Imidazole
GuNTA-500 Buffer:

20mM Tris-HCl pH7.9, 0.5M NaCl, 10% Glycerol, 6M Guanidium HCl, 500mM Imidazole

附：NTA 树脂的再生

NTA 树脂在使用若干次数（3-5 次）后，结合效率有所下降，可以用以下方法再生，提高树脂的使用寿命和蛋白质的结合效率。NTA 树脂再生前需要从层析柱下端流干所有溶液，估计出 NTA 的树脂体积，按下列次序将再生试剂加到层析柱里，在等上一再生溶液流干后，再加下一再生溶解。用户需要自行准备 25%，50%，75%，100%（v/v）乙醇和去离子水。

NTA 再生步骤：

- (1) 从层析柱下端流干所有溶液，用 2 倍 NTA 树脂体积的 Stripping Solution I 洗。
- (2) 用 2 倍体积的去离子水洗。
- (3) 用 3 倍体积的 Stripping Solution II 洗。
- (4) 用 1 倍体积的 25%乙醇洗。
- (5) 用 1 倍体积的 50%乙醇洗。
- (6) 用 1 倍体积的 75%乙醇洗。
- (7) 用 5 倍体积的 100%乙醇洗。
- (8) 用 1 倍体积的 75%乙醇洗。
- (9) 用 1 倍体积的 50%乙醇洗。
- (10) 用 1 倍体积的 25%乙醇洗。
- (11) 用 1 倍体积的去离子水洗。
- (12) 用 5 倍体积的 Stripping Solution III 洗。
- (13) 用 3 倍体积的去离子水洗。
- (14) 如果立即使用，用 5 倍体积的 Ni Charging Solution 洗，再用 10 倍体积的平衡溶液(NTA-0 Buffer 或 GuNTA-0 Buffer) 洗。
- (15) 如果想长期储存，加入 1 倍体积的 20%乙醇，4 度保存，使用前需要执行步骤 14。



上海闪晶分子生物科技有限公司

地址：上海市闵行区北桥镇吴河路328号A栋2楼

邮编：201109

联系：市场部

电话：5446 0832 800-988-1995

E-mail:master@shinegene.org.cn

网址：www.shinegene.org.cn

