

HIS纯化Kit说明书

一、简介

金属螯合亲和色谱，又称固定金属离子亲和色谱，其原理是利用蛋白质表面的一些氨基酸，如组氨酸能与多种过渡金属离子 Cu^{2+} ， Zn^{2+} ， Ni^{2+} ， Co^{2+} ， Fe^{3+} 发生特殊的相互作用，利用这个原理可以把富含这类氨基酸的蛋白质吸附，从而达到分离的目的。由于这个原因，偶联这些金属离子的琼脂糖凝胶就能够选择性地分离出这些含有多个组氨酸的蛋白以及对金属离子有吸附作用的多肽、蛋白和核苷酸。半胱氨酸和色氨酸也能与固定金属离子结合，但这种结合力要远小于组氨酸残基与金属离子的结合力。

试剂盒包括重力流亲和柱子和各 100ml 平衡和洗脱用的缓冲液，填料可以由普通的镍琼脂糖凝胶换成镍 NTA 琼脂糖凝胶，镍 NTA 琼脂糖凝胶 FF 具特异性好流速快，螯合镍更稳定，能耐受更高的还原剂，物理和化学稳定性好，批次重复性好。此试剂盒操作方便，重复性好，如果不清楚本公司还将提供最专业的技术支持。

二、试剂盒特征：

试剂盒组成	包括 2, 5 或 10 毫升预装柱，10 倍浓缩平衡缓冲液 1 及 5 倍浓缩洗脱缓冲液 2 各 25 (2ml 柱)，50 (5ml 柱) 或 100ml (10ml 柱)
特点	基团密度高，载量大，分辨率高，使用方便。
基质	6% 的交联琼脂糖凝胶
配基	Ni^{2+}
配基密度	20-40 $\mu\text{mol/ml}$
吸附载量	$\leq 15\text{mg/ml}$
填料的颗粒大小	45-165 μm
最大流速	600cm/h
pH 范围	3-10，在位清洗时 pH 范围可到 2-11
保存温度	+4~8 $^{\circ}\text{C}$
保存液体	20% 乙醇

三、适用范围

分离能被金属离子吸附的多肽、蛋白、核苷酸、磷酸化蛋白及带 His 标签的重组蛋白。

四、应用实例

实验名称：HIS 纯化 KIT 分离带 His 标签的重组蛋白

缓冲液组成：

为避免浪费溶液可以计算所需要的量按比例稀释。此缓冲液为基本配方，如果是变性条件下

纯化，只需要在稀释缓冲液中加入适当的变性剂配成 8M 尿素或者 6M 盐酸胍，把 pH 调到原来的值即可。浓缩缓冲液方便保持，而稀释的缓冲液不好保持，所以最好现配现用。

缓冲液 1: 100mM pH7.9 的 Tris-HCl 缓冲液含 2.5M NaCl 使用需要用水稀释到 10 倍,如 10 毫升加蒸馏水配成 100ml。

缓冲液 2: 50mM pH7.9 的 Tris-HCl 缓冲液含 1.25M NaCl 及 2M 咪唑,使用需要用水稀释到 5 倍,如 20 毫升加蒸馏水配成 100ml。

缓冲液 3: 不同咪唑浓度的缓冲液 B 配制(100ml):

咪唑浓度	缓冲液 1 量(ml)	缓冲液 2 量(ml)
20 mM	95	5
50 mM	88.5	12.5
100 mM	75	25
200 mM	50	50
300mM	25	75
400 mM	0	100

实验步骤:

- 1、取出柱子，小心侧掰打开柱子上的塞子，然后把柱子固定，要注意不能垂直拔出盖子，否则会破坏装填好的柱子。然后用固定柱子，使柱子垂直，小心把柱子下端的旋扭上推，把柱子上部的 20% 乙醇流空。
- 2、用**缓冲液 1** 平衡 10 个床体积，控制流速为 1ml/min
- 3、将 20ml 细菌破碎液调 pH 到 7.9，0.45 μ m 滤膜过滤，上样，流速为 1ml/min
- 4、用**缓冲液 1** 再洗 10 个柱床体积，流速为 1ml/min
- 5、用分别含 50、100、400mM mM 咪唑的**缓冲液 3** 进行阶段洗脱，流速为 2ml/min，收集各阶段洗脱峰，每个浓度洗脱 5 个柱床体积，用 SDS-PAGE 检测融合蛋白的分子量大小和纯度
- 6、用纯水流洗 5 个柱床体积，再用 20% 的乙醇流洗 5 个柱床体积，流速为 2ml/min，关闭下口，再在柱子的填料上保持 2 厘米左右的液体，封闭上口，于 +4~8℃ 环境中保存，

SDS-PAGE 流程:

- 1 BCA 法测量样品蛋白浓度
- 2 根据测定样品的蛋白浓度，算出 5-10 μ g/孔所需的体积。
- 3 向 1.5ml EP 管中加入含 5-10 μ g 蛋白的样品溶液，若体积小于 10 μ l，则加 20mM PBS pH7.4 补足 10 μ l；若体积大于 10 μ l，则要加入 1ml 无水乙醇，-20℃ 下浓缩 1h。
- 4 取浓缩样品 10000rpm 离心 15min，除去上清，37℃ 烘箱 10min 去除残余的乙醇。
- 5 在样品加入 20mM PBS pH7.4 和 2 \times loading buffer 各 10 μ l，100℃ 下 10min。取出后用冷

却 30s, 4000rpm 离心 1s。
6 点样, 电泳。

(一) 分离 His 标签重组蛋白包涵体

条件和前面的方法基本相同, 只是缓冲液中加了 8M 的脲, 溶液配方如下表

要注意的是不同的包涵体溶解度不同, 也可以用 6M 盐酸胍代替 8M 脲, 因为盐酸胍溶解包涵体更完全。

缓冲液组成:

缓冲液 1: 50mM pH7.4 的 PBS 缓冲液。配制: 0.5M NaH₂PO₄ 19ml, 0.5M Na₂HPO₄ 81ml, NaCl 29.3g 和脲 480 g, 加热溶解后定容到 1000ml。

缓冲液 2: 50mM 磷酸盐缓冲液, pH7.4, 即 pH7.4 的 PBS 溶液。配制: 0.5M NaH₂PO₄ 19ml, 0.5M Na₂HPO₄ 81ml, NaCl 29.3g, 咪唑 34g 和脲 480 g, 加热溶解后定容到 1000ml。

缓冲液 3: 不同咪唑浓度的缓冲液 B 配制:

咪唑浓度	缓冲液 1 量(ml)	缓冲液 2 量(ml)
50 mM	90	10
400 mM	20	80

(二) 不同金属离子及洗脱条件对纯化效果的影响

使用色谱填料为镍琼脂糖凝胶 FF, His 标签重组蛋白的上样量为 10ml, 用含有 20、50、100、200、500mM 咪唑的缓冲液 3 洗脱, 缓冲液 1 和 2 均加入终浓度为 1% 的吐温 80, 其结果表明加入表面活性剂可以降低杂吸附。此外分别螯合铜钴金属离子做同样的纯化实验, 结果表明在回收率和纯度上都以螯合镍离子的效果最好, 其分离纯化的纯度可以 >90%, 而目标蛋白的回收率高达 80%, 所以建议首选镍离子螯合填料, 别的可以不用考虑。

五、 应用的注意事项:

HIS 纯化 KIT 使用的是镍琼脂糖凝胶 FF 的配基是最经典的 IDA, 镍离子有六个螯合价数, Ni-IDA 螯合了三价, 剩余三价, 而 Ni-NTA 是四价的, 剩余是两价, 因此 Ni-IDA 琼脂糖凝胶作用力要比 Ni-NTA 琼脂糖凝胶的强, 也正因为这个原因, 所以在同样条件下 Ni-IDA 洗杂质和目标蛋白的要比 Ni-NTA 的咪唑浓度高, 但是 NTA 的填料更稳定, 耐受更强的还原剂, 更不容易脱落。而 IDA 的载量要比 NTA 高, 可以反复利用, 更加经济。

本公司的镍琼脂糖凝胶由于配基密度高, 所以载量和作用力都比进口的都大。和这些填料相比需要更强的洗脱条件, 特别是和 NTA 类的填料相比, 镍琼脂糖凝胶需要 50-100mM 咪唑洗去杂质, 也可以直接在上样的样品中加 30-40mM 咪唑提高特异性, 洗脱也许需要高到 500mM 咪唑。所以不能完全照搬 NTA 填料的洗脱条件。此外我们也提供镍 NTA 琼脂糖凝胶, 它一般要用 25-40mM 咪唑洗杂蛋白, 用 250-400mM 咪唑洗脱目标蛋白, 同样可以在上样样品和平衡缓冲液中添加 10-20mM 咪唑提高特异性。而具体用哪个填料完全看个人

的习惯以及纯化的条件而决定。

1) 固定金属离子

- 1、金属离子的固定必须用过滤好的金属离子溶液，以防止金属盐在胶上沉淀。
- 2、用 2-5 倍柱床体积的蒸馏水充分平衡柱子。
- 3、选择合适的金属离子 (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} 等)，溶解在中性或弱酸性的溶液中，浓度为 0.1-0.3M。如果是 Fe^{3+} 必须在低pH下螯合 (pH 3)，以防止 Fe^{3+} 产生沉淀。
- 4、用 2-5 个柱床体积的金属离子溶液上柱，再用不少于 5 倍柱床体积的蒸馏水洗涤色谱柱，洗去未螯合的金属离子。(当然也可以直接把洗净没有螯合的填料直接和需要的金属离子溶液在摇床上震荡过夜，这样螯合效果更好，镍 NTA 琼脂糖凝胶尤其适合用这样的方法。)
- 5、用 2-5 倍柱床体积的起始缓冲溶液平衡柱子，再上样。
- 6、如果是螯合铁离子，要注意的是在中性条件下， Fe^{3+} 很容易被还原而生成沉淀，所以 Fe^{3+} 溶液的pH最好是 3-5。螯合 Fe^{3+} 的色谱柱不能长时间保存在中性溶液中。建议每次用完后都要将螯合的 Fe^{3+} 用 50 mM EDTA溶液洗净，下次使用时再重新螯合。如果洗不干净，也可以将凝胶浸在 50 mM的EDTA中过夜后再清洗保存。

2) 上样

- 1、样品通溶解在 pH5.5-8.5 的缓冲液中，提高上样缓冲液的 pH 值，可以增大载量。
- 2、选择起始缓冲液，主要是依据金属离子的特性及样品与金属离子的结合特性。
- 3、缓冲液中不能含有 EDTA 和柠檬酸盐，也最好不含巯基乙醇等还原剂。
- 4、常用缓冲液有 10-20m M 磷酸钠盐缓冲液和 50mM 醋酸钠缓冲液
- 5、在缓冲液中要加入 0.15-0.5M 的 NaCl，以消除离子交换作用。
- 6、使用金属螯合色谱有一个通常的法则，如果不了解蛋白的结合特性，建议先选用 Zn^{2+} ，缓冲液可以选择中性的磷酸盐或者醋酸盐缓冲液，NaCl的含量为 0.15-0.5M，作为起始缓冲液。
- 7、缓冲液中的去污剂一般不会影响对蛋白的吸附作用。
- 8、蛋白被吸附时，经常会有一部分的螯合金属离子被替换。这种现象通常是可见的，尤其是使用有色的金属离子时，比如 Cu^{2+} ，所以使用几次后可以先把金属离子洗下来，然后再重新螯合金属离子。

3) 洗脱

- 1、线性降低或一步降低 pH。大多数蛋白在 pH6-4 会被洗脱下来，也可以在 pH 3-4，缓冲液可以是醋酸钠、柠檬酸、磷酸盐缓冲体系。
- 2、竞争性洗脱：线性增加或一步增加与金属离子有亲和力的物质，如 0-0.5M咪唑，0-50 mM组氨酸，0-2M NH_4Cl 。梯度洗脱最好在起始缓冲液的恒定pH下进行。
- 3、EDTA、EGTA 等螯合剂会与金属离子产生作用力，导致蛋白被洗脱下来。这种方法不能使不同的蛋白分离，此外会影响蛋白吸附，导致融合蛋白不能挂柱。
- 4、所有上述情况中，缓冲液中必须加入 0.15-0.5M 的 NaCl 以消除离子交换作用。

六、再生、清洗、保存

1) 凝胶的再生

- 1、螯合一种新的金属离子之前，必须将胶再生。用 5-10 倍体积的 50 mM EDTA 淋洗

柱子，再用 2-3 倍体积的 0.5M NaCl 洗掉残留的 EDTA。

2、金属离子的重新固定的方法如前文所述。在一些操作中，变性蛋白和脂质不能在柱子的再生过程中被洗脱下来，他们可以通过在位清洗被除去。

2) 在位清洗

1、除去因离子交换作用吸附的蛋白，用 2-3 倍柱床体积 2M 的 NaCl 溶液淋洗柱子，再反向淋洗。

2、除去蛋白沉淀、疏水性蛋白，用 1M 的 NaOH 以 100cm/h 的速度淋洗柱子 1h。

3、所有操作中，都要用至少 3 倍柱床体积的初始缓冲液洗柱子。

4、除去强的疏水性蛋白和脂质等，用 4 倍柱床体积的 70%的乙醇或者 30%的异丙醇洗柱子，再反向淋洗。

七、保存

在 20%乙醇中，4℃下长期保存。

本产品有严格的生产质量控制标准，我们力求为您提供最满意的产品、最完备的技术支持和服务，欢迎业内朋友交流合作。

除了为您提供各种包装规格的 **HIS 纯化 KIT** 外，**还新推出 GST 纯化 Kit，使纯化更简单，此外客户也可以选择镍 NTA 琼脂糖凝胶代替现在的填料，只是价格不同。**

我们还提供其它各种填料、柱子和其他服务，包括：

- 1、填料和柱子选择以及预实验
- 2、开发各种生物大分子的分离纯化工艺，为您解决分离纯化的难题
- 3、帮助您合成特殊要求的色谱填料，包括偶联各种配基
- 4、按客户要求提供各种填料及规格的预装柱，并配相应接口用于各种纯化设备。
- 5、代理各种进口填料，为客户提供最专业的售前和售后服务。

产品目录：

产品序列号	产品名称	包装	特性及应用
CC-K01-02	HIS纯化Kit	2ml 镍柱，各 25ml 浓缩平衡及洗脱缓冲液	分离和金属作用的多肽、蛋白核苷酸
CC-K01-05	HIS纯化Kit	5ml 镍柱，各 50ml 浓缩平衡及洗脱缓冲液	分离和金属作用的多肽、蛋白核苷酸
CC-K01-10	HIS纯化Kit	10ml 镍柱，各 100ml 浓缩平衡及洗脱缓冲液	分离和金属作用的多肽、蛋白核苷酸

北京韦氏博慧色谱科技有限公司

电话：010-67804548 13911415318：联系人:韦新桂 E-mail: weixingui@263.net

公司网站: www.wsac.cn 传真：010-67804548。

定货请参考光盘中的定货须知。购买本公司产品可获得一张内容非常丰富的纯化光盘，包括表达，提取，分离，酶切等操作指南以及各公司纯化产品的说明书及手册，是生物大分子分离纯化难得的学习材料。