

# PROTOCOLS&APPLICATION

Ni-NTA Agarose

## NPI-10 (天然条件Binding/Lysis Buffer, 1L)

50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6.90g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O(MW 137.99g/mol)

300mM NaCl 17.54g NaCl(MW68.08g/mol)

10mM imidazole 0.68g咪唑(MW68.8g/mol)

NaOH调整PH至8.0, 滤膜过滤

附录A :

Buffer 成分

当从昆虫细胞或动物细胞制备清澈的菌液时, 1%Igepal CA-630(Nonidet P40)应该加入到LysisBuffer中

## NPI-20(天然条件Wash Buffer, 1L)

50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6.90g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O(MW 137.99g/mol)

300mM NaCl 17.54g NaCl(MW68.08g/mol)

20mM imidazole 1.36g咪唑(MW68.8g/mol)

NaOH调整PH至8.0, 滤膜过滤

## NPI-250 (天然条件Elution Buffer., 1L)

50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6.90g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O(MW 137.99g/mol)

300mM NaCl 17.54g NaCl(MW68.08g/mol)

250mM imidazole 17.0g咪唑(MW68.8g/mol)

NaOH调整PH至8.0, 滤膜过滤

## BufferB (变性条件Lysis/Binding Buffer, 1L)

8M 尿素 480.50g尿素 (60.06g/mol)

100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13.80g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O(MW 137.99g/mol)

100mM Tris · Cl 12.10g Tris(MW121.1g/mol)

HCl调整PH至8.0, 滤膜过滤

## BufferB/7M尿素 (变性条件Lysis/Binding Buffer, 1L)

7M 尿素 394.20g尿素 (60.06g/mol)

100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13.80g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O(MW 137.99g/mol)

100mM Tris · Cl 12.10g Tris(MW121.1g/mol)

HCl调整PH至8.0, 滤膜过滤

## BufferC (变性条件Wash Buffer, 1L)

8M 尿素 480.50g尿素 (60.06g/mol)

100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13.80g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O(MW 137.99g/mol)

100mM Tris · Cl 12.10g Tris(MW121.1g/mol)

HCl调整PH至6.3, 滤膜过滤

## BufferE (变性条件Elution Buffer, 1L)

8M 尿素 480.50g尿素 (60.06g/mol)

100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13.80g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O(MW 137.99g/mol)

100mM Tris · Cl 12.10g Tris(MW121.1g/mol)

HCl调整PH至4.5, 滤膜过滤

## PBS (1L)

50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6.90g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O(MW 137.99g/mol)

150mM NaCl 8.77g NaCl(MW68.08g/mol)

NaOH调整PH至7.2, 滤膜过滤

## 2XSDS-PAGE样品Buffer

0.09M Tris · Cl, PH 6.8; 20%甘油 (glycerol); 2%SDS; 0.02%溴酚蓝; 0.1M DTT

## PROTOCOLS&amp;APPLICATION

## Ni-NTA Agarose

## 附录B:

## 清洗和再生

清洗和再生 Ni-NTA 层析柱 ( Cartridge)

**定位清洗说明**

如果背景压力增大或者基质上有了明显的污染物, 就要实行定位清洗, 就可以完全恢复它的特性。介于所有Ni-NTA IMAC基质的高螯合强度和低的金属浸出速率, 因此定位清洗之前不用拆下膜。我们推荐使用下列方法除去杂质例如沉淀蛋白, 疏水蛋白, 脂蛋白。

**步骤**

- 1、15倍体积0.5M NaOH 清洗cartridge。接触时间要达到30分钟, 适当调节流速 (1ml Ni-NTA 流速为0.5ml/min, 总体积为15ml)
- 2、重新平衡, 适用10倍体积的Buffer NPI-10  
此时Cartridge可以再次使用。储存要在20-30%乙醇或10-100mM NaOH中。

**拆膜再生和重新装柱**

对于Ni-NTA 层析柱 Cartridge, 拆膜和重装一般是不必要的。如果背景压力增大或者基质上有了明显的污染物, 定位清洗一般就可以恢复性质。但是, 如果柱子性质还是让人不满意, Ni-NTA基质就需要依照下列步骤进行重装。

**步骤**

- 1、10倍体积的 stripping Buffer (50mM 磷酸钠 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>); 300mM NaCl; 100mM EDTA; pH8.0)
- 2、用20倍体积去离子水wash基质
- 3、用2倍体积的100mM NiSO<sub>4</sub> (去离子水溶解) 装载水洗过的cartridge。盐和其它其金属离子 (氯化物或硫酸盐) 药物可以使用
- 4、10倍体积去离子水洗柱, 10倍体积Buffer NPI-10重新平衡  
Cartridge此时即可以使用。储存应在20-30%乙醇或10-100mM NaOH中。

**另一再生方案**

- 1、2倍再生水 (6M盐酸胍, 0.2M醋酸)
- 2、5倍水
- 3、3倍2% SDS
- 4、1倍25%乙醇
- 5、1倍50%乙醇
- 6、1倍75%乙醇
- 7、1倍100%乙醇
- 8、1倍75%乙醇
- 9、1倍50%乙醇
- 10、1倍25%乙醇
- 11、1倍水
- 12、5倍100mM EDTA. PH8.0
- 13、10倍水
- 14、2倍100mM NiSO<sub>4</sub>Recharge
- 15、2倍水冲洗
- 16、2倍再生Buffer冲洗
- 17、2倍适宜的Buffer平衡 (BufferNPI-10, BufferB)