



珀罗汀生物  
PLD TECHNOLOGY

## 蛋白纯化试剂盒 (Ni 珠版)

苏州珀罗汀生物技术有限公司  
Suzhou PLD Technology, Co., Ltd

修订日期: 2024 年 2 月 23 日

# 目录

试剂盒组成、贮存、稳定性	2
注意事项	2
实验准备	3
实验操作步骤	3
实验可能出现的问题及解决方案	5

## 一. 试剂盒组成、贮存、稳定性

制备次数	12 次
试剂	
Ni 珠	600 $\mu$ L
孵育液	9 mL
洗涤液	36 mL
洗脱液	2.4 mL
平衡液	2.4 mL

Ni 珠、孵育液、洗涤液、洗脱液和平衡液：需 4℃ 冷藏密闭保存。

## 二. 注意事项

操作时要带乳胶手套和眼镜，避免沾染皮肤、眼睛和衣服，谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛时，要立即用大量清水或生理盐水冲洗，必要时寻求医疗咨询。

Ni 珠保存过程中应避免冷冻/干燥和高速离心等操作，否则会破坏 Ni 珠的结构，严重影响蛋白结合能力。

在使用 Ni 珠前，请温和的、充分的震荡，使 Ni 珠保持均匀的悬浮状态。

### 三. 实验准备

1、准备 4 度离心机、旋转混合仪。

### 四. 实验操作步骤

#### A. Ni 珠准备：

将 Ni 珠充分混匀，使用移液器取 50 $\mu$ L Ni 珠悬浮液，置于 1.5mL 离心管中，在 4 $^{\circ}$ C，1000g 下离心 10s，用移液器移除上清液。

注：在使用 Ni 珠前，请温和的、充分的震荡，使 Ni 珠保持均匀的悬浮状态。

#### B. Ni 珠平衡：

将离心管从管架上取下，加入 100 $\mu$ L 平衡液，涡旋仪轻微震荡 2 到 3 次，每次 2-3s，，在 4 $^{\circ}$ C，1000g 下离心 10s，用移液器移除上清液。

再重复用平衡液洗涤 1 次。

### C. Ni 珠结合目的蛋白:

将 750 $\mu$ L 孵育液加入到处理好的 Ni 珠，添加约 200~300 $\mu$ L CFPS 反应液上清，颠倒混匀。将离心管置于旋转混合仪上，4 $^{\circ}$ C 孵育 1~2h。

### D. 洗杂:

在 4 $^{\circ}$ C，1000g 下离心 10s，用移液器移出上清液，保留，以备取样检测。

向离心管中加 1mL 洗涤液，涡旋仪震荡 2 到 3 次，每次 2~3s，其余时间置于冰上，保持低温，在 4 $^{\circ}$ C，1000g 下离心 10s，用移液器吸取上清液，保留，以备取样检测。

再重复上述步骤 2 次。

### E. 洗脱目标蛋白:

将 100 $\mu$ L 洗脱液加入到离心管中混匀，涡旋仪震荡 2 到 3 次，每次 2~3s，其余时间置于冰上，保持低温，在 4 $^{\circ}$ C，1000g 下离心 10s，用移液器吸取上清液，即为目的蛋白洗脱液。

如有必要可重复上述步骤 1 次，提高目的蛋白的回收量。

注：可以根据需要改变洗脱体积从而达到调整目标蛋白浓度的目的。

## 五. 实验可能出现的问题及解决方案

问题	可能原因	解决方式
蛋白无法与 Ni 珠结合	His 标签丢失	测序检查基因序列的读码框是否正确, WB 检查 His 是否表达, 改变 His-tag 的位置(C- 端或 N- 端), 必要时增加 His 个数
	结合不充分	增加 Ni 珠与蛋白结合时间 (如 4°C 过夜)。
目的蛋白被洗涤液洗脱	洗涤液咪唑浓度过高	降低洗涤液中的咪唑浓度 (可用平衡液稀释)
蛋白无法洗脱	洗脱条件太温和 (融合蛋白质仍然结合在 Ni 珠上, 结合力较强)	增加洗脱时间; 增加咪唑的梯度洗脱来找出最佳的洗脱条件。
洗脱的目的蛋白中杂质较多	蛋白酶会部分降解目的蛋白	在蛋白纯化过程中, 可以添加蛋白酶抑制剂来避免蛋白酶的活性, 从而减少蛋白降解的情况。但需要

		注意，某些蛋白酶抑制剂可能对纯化效果有一定的影响，因此需要选择适当的抑制剂，并进行优化。
	洗涤不充分	增加洗涤的次数，充分洗涤。
	有非目的带标签的蛋白表达	检查基因内部是否含有起始密码子(C 端标记蛋白)或者提前终止位点(N 端标记蛋白)



**苏州珀罗汀生物技术有限公司**

苏州工业园区界浦路69号维力医疗科创园1号楼302室

☎ 0512-67900128   ✉ sz\_protein@163.com   🌐 www.cellfreeprotein.cn

