Ni-NTA Spin Kit
实验操作方法

Protein Purification under Denaturing Conditions from E. coli Lysates（变性条件下纯化蛋白）

试剂准备

Buffer A: 6 M GuHCl; 0.1 M NaH2PO4;; pH 8.0

Buffer B: 7M urea: 7 M urea; 0.1 M NaH2PO4; pH 8.0

Buffer C: 8 M urea; 0.1 M NaH2PO4; pH 6.3

Buffer D: 8 M urea; 0.1 M NaH2PO4;·HCl; pH 5.9

Buffer E: 8 M urea; 0.1 M NaH2PO4; pH 4.5

Protocol

1. 收集5ml诱导表达的菌液（表达量少时，适当提高菌液量）， 4000 x g 15 min.放入冰箱冻融1～3次(不冻融，后续实验需要超声破碎) ，
2. 以700μl Buffer B 重悬，加入Buffer F,
3. 室温振荡 15min,直至菌液变清亮。
   细菌裂解后，菌液变清亮，此时可以直接SDS-PAGE；如果细菌或蛋白不溶解，请改用Buffer A 。GuHCl与SDS形成沉淀，稀释6倍后再做SDS-PAGE，或用TCA沉淀蛋白后再做。Buffer F 中的酶在GuHCl>100 mM.是没有活性的，基因组DNA 可以通过离心除去。
4. 12,000 x g 室温离心 15–30 min ，取上清转入另1.5ml 1.5ml离心管， Save 20 μl of the cleared lysate for SDS-PAGE analysis.
5. 充分振荡混匀Ni-NTA Agarose ,加入200ul与上清液中，混匀。
6. 把上述步的Ni-NTA Agarose混合液，全部转入离心柱中，270 x g (approx. 1600 rpm)离心 5 min,
7. 以600 μl Buffer C.洗涤 Ni-NTA spin Agarose ，890 x g (approx. 2900 rpm)离心 2 min
8. Repeat step7.
9. 以 200 μl Buffer E 洗脱两次， 890 x g (approx. 2900 rpm)离心 2 min

Protocol: Protein Purification under Native Conditions from E. coli Lysates（天然条件下纯化蛋白）

试剂准备

Lysis Buffer (NPI-10): 50 mM NaH2PO4, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0

Wash Buffer (NPI-20): 50 mM NaH2PO4, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0

Elution Buffer (NPI-500): 50 mM NaH2PO4, 300 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 8.0

Protocol

1. 收集 5ml 诱导表达的菌液（表达量少时，适当提高菌液量）， 4000 x g 15 min.放入冰箱冻融 1～3 次(不冻融，后续实验需要超声破碎) ，
2. 以700 μl 630 μl Lysis Buffer NPI-10重悬，加入Buffer F,
3. 冰浴 15–30 min，直至菌液变清亮
4. 12,000 x g 室温离心 15–30 min ，取上清转入另1.5ml离心管
5. 充分振荡混匀Ni-NTA Agarose ,加入200ul与上清液中，混匀。
6. 把上述步的Ni-NTA Agarose混合液，全部转入离心柱中，270 x g (approx. 1600 rpm)离心 5 min,
7. 以600μl Buffer C.洗涤 Ni-NTA spin Agarose ，890 x g (approx. 2900 rpm)离心 2 min
8. Repeat step7.
9. 以 200 μl Buffer E 洗脱两次，C890 x g (approx. 2900 rpm)离心 2 min