



双洗涤策略 · 三种纯化模式 · 纯度与得率可调

NovaPure™

昆虫细胞专属 His 标签蛋白小量纯化试剂盒

NovaPure™ Insect Cell-Specific His-Tagged Protein Mini Purification Kit (10 Preps)

适用细胞：Sf9 / Sf21 / High Five (Hi5) | 适用目标：His 标签可溶性重组蛋白 | 仅供科研使用

文件编号	版本号	生效日期	页码
WD-IFU-NovaPure-INS	V1.0	2026 年 08 月 10 日	见页脚

目 录

第一章 产品简介	1
1.1 昆虫细胞的镍柱纯化，难在哪里	1
1.2 核心亮点	1
1.3 三种纯化模式一览	1
第二章 预期用途与适用范围	1
2.1 适用范围	1
2.2 不适用 / 需另行评估	2
第三章 产品信息	2
第四章 操作流程（SOP）	2
4.1 裂解与澄清	2
4.2 纯化操作	3
4.2.1 管内结合-柱上洗脱法（推荐）	3
4.2.2 孵育法	4
4.2.2 过柱法	5
第五章 ⚠️ 填料重复使用与风险提示	6
第六章 常见问题排查	7

第一章 产品概述

1.1 简介

用通用镍柱试剂盒纯化昆虫细胞表达的 His 标签蛋白，跑完 SDS-PAGE 常会看到同样的画面：目标条带出来了，但上下总跟着几条挥之不去的杂带。这不是操作失误，而是体系本身的特点——昆虫细胞裂解液中存在多种表面组氨酸富集的内源蛋白，它们与镍离子有真实的亲和力；杆状病毒感染后期释放的蛋白与细胞碎片会加剧非特异吸附；无血清培养基中的游离组氨酸还会与 His 标签竞争结合位点。这些因素叠加，使昆虫细胞体系的纯化本底显著高于大肠杆菌体系。

针对这一痛点，NovaPure™ 昆虫细胞专属 His 标签蛋白小量纯化试剂盒进行了针对性优化。我们摒弃了传统单一洗涤液的局限，提供 Wash Buffer A 与 Wash Buffer B 双重洗涤系统，并为用户定制了两种极简洗涤策略：方案 A（纯度优先）：先使用 Wash A 去除大量昆虫细胞特有杂质，再串联 Wash B 深度清洗。通过双缓冲液的阶梯式洗杂，彻底斩断内源杂带，获得极高纯度的目标蛋白。方案 B（得率优先）：仅使用 Wash B 进行单步温和洗涤。在快速去除非特异性吸附的同时，尽最大可能保留目标蛋白，锁定极限回收率。

此外，试剂盒完美兼容管内结合-柱上洗脱法、离心孵育法和重力流过柱法三种纯化模式，全面适配从低表达到高黏度体系的各种复杂样本。

1.2 三种纯化模式一览

模式	适用情形	参考耗时	相对得率	相对纯度
管内结合-柱上洗脱法（推荐）	对纯度与得率同时有要求；关键批次与放行样品	45- 90 min	高	高
孵育法	样品体积大、黏度高或表达量低；含少量颗粒	60-90 min	高	中
过柱法	样品澄清、表达量充足；追求速度与平行通量	30-45 min	中	较高

第二章 预期用途与适用范围

2.1 适用范围

- 宿主细胞：Sf9、Sf21、High Five (Hi5) 等鳞翅目昆虫细胞。
- 表达体系：NovaBac™ 杆状病毒表达系统、NovaRapid™ 快速瞬时表达系统及其他昆虫细胞表达体系。
- 目标蛋白：带 His-tag (His₆-His₁₀) 的可溶性重组蛋白，胞内表达或分泌至培养基中均可。

- 样品类型：细胞裂解上清、培养上清、以及 NovaLyse™ 直接裂解产物。

2.2 不适用 / 需另行评估

- 变性条件纯化（6 M 盐酸胍 / 8 M 尿素）与包涵体处理。
- 跨膜蛋白（请使用唯地生物 NovaMem™ 膜蛋白提取试剂盒）。
- 含 EDTA、EGTA 或 > 1 mM DTT 的样品，须先脱盐或稀释后使用。
- 无 His 标签蛋白，或标签被埋于蛋白内部而不可及的构建体。

第三章 产品信息

规格与货号

产品名称	规格	货号
NovaPure™ 昆虫细胞专属 His 标签蛋白小量纯化试剂盒	10 次（1 ml 培养物， 200 μL 填料/次）	INK3401

组份与储存

编号	货号	组分名称	规格	储存
A	CO5001	NovaPure™ Ni NTA Beads（镍填料）	2 mL	2–8 °C，严禁冻存
B	BS5001	NovaPure™ Binding/Equilibration Buffer（结合 / 平衡缓冲液）	50 mL	室温或 2–8 °C
C	BS5002	NovaPure™ Wash Buffer A（高纯度洗涤液）	50 mL	室温或 2–8 °C
D	BS5003	NovaPure™ Wash Buffer B（高得率洗涤液）	50 mL	室温或 2–8 °C
E	BS5004	NovaPure™ Elution Buffer（洗脱缓冲液）	30 mL	室温或 2–8 °C
F	CO5101	NovaPure™ 1.5 ml 空柱	10 支	室温

储存提示：填料（组分 A）严禁冷冻。冻融会导致琼脂糖基质破碎、柱床压实、流速与载量不可逆下降。

缓冲液出现沉淀时，可 37 °C 温浴至完全澄清并冷却至室温后使用；若出现浑浊、絮状物或颜色异常，请勿使用。

首次开瓶请记录开封日期；具体有效期以标签为准。

第四章 操作流程（SOP）

4.1 裂解与澄清



021-34790199


www.weidibio.com

sales@weidibio.com


上海市闵行区江月路 999 号 3 号楼 302 室

1. 样本处理与裂解

- ✧ **NovaLyse™ 极简裂解法（强烈推荐）：**向 1 mL 包含细胞的昆虫细胞完整培养物中，直接加入 100 μ L 的 10 $\times$ NovaLyse™ 昆虫细胞裂解试剂，上下颠倒混匀。（无需超声设备，避免发热导致蛋白变性）
- ✧ **传统机械破碎法：**1 ml 培养物 500 g $\times$ 5 min 离心弃去上清，收集细胞沉淀，加入 PBS 清洗一次，再次离心；随后加入加入 NovaPure™ Binding/Equilibration Buffer 重悬沉淀后，使用超声或高压匀质机进行机械破碎。

2. 体系处理

加入 1~2 μ L 全能核酸酶（Benzonase Nuclease，货号：GR5015）及 2 μ L 500 $\times$ Protease Inhibitor Cocktails (EDTA free)（货号：GR4001），室温孵育 15 min。

4. 样本澄清

- ✧ **使用 NovaLyse™ 的样本：**免去离心与过滤！可直接跳过澄清步骤，直接上柱纯化，大幅缩短实验周期。
- ✧ **使用传统破碎法的样本：**需 12,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C 离心 20 min 取上清；若上清仍浑浊，需额外使用 0.45 μ m 滤膜过滤（易导致蛋白损耗）。

4.2 纯化操作

推荐使用管内结合-柱上洗脱法，可同时获得较高纯度与得率。

4.2.1 管内结合-柱上洗脱法（推荐）

操作提示：本方法先在离心管中让样本与填料充分结合，再转移至纯化柱中完成洗杂与洗脱。既保证了目标蛋白的极致捕获率，又确保了洗涤的彻底性。

1. 填料准备与平衡

（1）取用填料：用剪刀将 1 mL 枪头尖端剪去（防止吸取时剪切力破坏微球），充分摇匀树脂后，吸取 100~200 μ L 填料至干净的 1.5 mL 离心管中。

（2）填料平衡：向管中加入 1 mL NovaPure™ Binding/Equilibration Buffer，轻柔颠倒混匀。随后 500 $\times$ g 离心 2 min，吸弃上清。

（3）重复平衡：重复上述步骤一次，完成填料平衡。

2. 加样与孵育

（1）混合样本：将裂解好的样本（约 1 mL）加入上述装有平衡填料的离心管中。

（2）温和结合：将离心管置于 4 $^{\circ}$ C 旋转混匀器上，孵育 15~60 min。（注：如为低表达量样本，孵育时间可延长至 2 小时）。

⚠️ 严禁剧烈旋涡：琼脂糖微球若收机械力剧烈破坏会产生碎屑，后续将严重导致纯化堵塞或流速骤降。

3. 装柱与收集流穿

（1）转移填料：将 NovaPure™ 1.5 mL 空柱插在单根收集管中；若需批量操作，可将其插在底部

可收集废液的方形管盒（如 1 mL 空枪头盒或 1.5 mL 离心管盒）的孔板上。移液器换上剪去尖端的枪头（防止剪切力破坏微球），将离心管内的“填料+样本”混合物轻轻混匀后，全部吸出并加入空柱中。

（2）形成柱床：由于混合体系总体积较大，建议分批加样。先吸取部分混合液（如 500 μ L）加入空柱，打开下口让液体自然流出，使填料截留在柱底初步形成柱床；待液体流干后，再次混匀离心管中剩余的液体并全部转移至柱中。装柱过程中流出的液体即为流穿液（建议暂时保留以备检测，取 20 μ L + 5 μ L 5 $\times$ Loading Buffer, SDS-PAGE）。

4. 差异化洗杂（2 选 1）

待液体完全流干后，请根据您的实验最终需求，选择以下一种洗杂方案：

✧ 方案 A（纯度优先——双重洗涤法）

Wash A 洗涤：加入 2 mL NovaPure™ Wash Buffer A 洗柱。

Wash B 洗涤：再用 2 mL NovaPure™ Wash Buffer B 洗柱。

✧ 方案 B（得率优先——简易洗涤法）

仅使用 Wash B：直接加入 2 mL NovaPure™ Wash Buffer B 洗柱。

5. 目标蛋白洗脱

（1）更换收集管：待洗杂液体完全流尽后，将纯化柱移入全新且干净的 1.5 mL 或 2.0 mL 离心管中。

（2）实施洗脱：向柱内加入 300 ~ 600 μ L NovaPure™ Elution Buffer，收集自然流出的液体，此即为含有高浓度目标蛋白的洗脱液。

（3）二次洗脱与定量：为追求极限得率，可重复上述步骤进行第二次洗脱。

为什么推荐这一模式： 孵育阶段保证了目标蛋白与填料的充分接触（尤其对低丰度或亲和力较弱的构建体），过柱阶段则以连续流冲洗替代离心洗涤，避免了每次弃上清时的填料损失与残留，最终在得率与纯度上都优于单独使用任一模式。

4.2.2 孵育法

本方法强烈推荐用于**高黏度样本**或**低表达量样本**。通过在管内进行长时间的液相翻转，让样本与填料达到最充分的物理接触，从而实现极限挂柱率。

1. 填料准备与平衡

（1）取用填料：移液器换上剪去尖端的 1 mL 枪头（防止剪切力破坏微球）。充分摇匀树脂后，吸取 100 ~ 200 μ L 填料至干净的 1.5 mL 离心管中。

（2）填料平衡：向管中加入 1 mL NovaPure™ Binding/Equilibration Buffer，轻柔颠倒混匀。500 $\times$ g 离心 2 min，小心吸弃上清（注意不要吸到管底的填料）。

（3）重复平衡 1 次，完成填料平衡。

2. 加样、孵育与收集流穿

（1）温和结合：将裂解好的样本（约 1 mL）加入上述装有平衡填料的离心管中。将离心管置于



4℃ 旋转混匀器上，孵育 30–60 min。（注：若蛋白表达量极低，建议将孵育时间延长至 2 小时以充分捕获）。

（2）收集流穿：孵育结束后，500 × g 离心 2 min 使填料沉降。小心吸出全部上清并妥善保留（此为流穿液，包含未结合的杂质及可能未挂柱的目标蛋白，建议保留以备后续电泳分析）。

3. 差异化洗杂（2 选 1）

请根据您的实验最终需求，选择以下一种洗杂方案：

✧ 方案 A（纯度优先 —— 双重洗涤法）

Wash A 洗涤：加入 1 mL NovaPure™ Wash Buffer A，颠倒混匀 5 min，500 × g 离心 2 min，弃上清。重复此步骤 1 次。

Wash B 洗涤：再换用 1 mL NovaPure™ Wash Buffer B，颠倒混匀 5 min，500 × g 离心 2 min，弃上清。重复此步骤 1 次。

✧ 方案 B（得率优先 —— 简易洗涤法）

仅使用 Wash B：直接加入 1 mL NovaPure™ Wash Buffer B，颠倒混匀 5 min，500 × g 离心 2 min，弃上清。重复此步骤 1 次。（特点：操作简便，尽最大可能保留目标蛋白，但可能伴随少量杂带）

4. 目标蛋白洗脱

（1）实施洗脱：向洗杂完成的离心管中，加入 300 ~ 600 μL NovaPure™ Elution Buffer。

（2）温和释放：颠倒混匀 10 min，让洗脱液与微球充分作用，将目标蛋白释放到液相中。

（3）收集产物：500 × g 离心 2 min，小心吸出的上清即为含有高浓度目标蛋白的洗脱液。

（4）极限回收（可选）：为确保蛋白被彻底洗脱，可重复一次。

4.2.2 过柱法

本方法最适合样品已彻底澄清且表达量充足的情形。由于全程依靠重力流连续冲洗，操作最快，且持续的液流能有效冲走非特异性杂质，显著降低纯化本底。

1. 填料装柱与平衡

（1）铺设柱床：充分摇匀树脂悬液。移液器换上剪去尖端的枪头，吸取 100–200 μL 填料直接加入 NovaPure™ 1.5 mL 空柱中。静置待填料自然沉降、形成平整的柱床后，打开空柱下口排出保存液。

（2）柱床平衡：向柱内加入 2 mL NovaPure™ Binding/Equilibration Buffer，让液体依靠重力自然滴落（流速约为 0.5–1.5 mL/min）。待液体完全流尽后，平衡完成。

2. 样品上柱与收集流穿

（1）首次缓慢加样：为防止冲散填料，请先关闭空柱下口。将澄清的样品沿柱壁缓慢滴加至柱中（注意不要超过最大容量），切勿直接冲击平整的柱床表面。

（2）由于样品总体积通常大于纯化柱容量，请进行分批加样：待柱内液体刚好流至接近填料表面

时（切勿使柱床干涸），再次沿柱壁缓慢加入下一批样品。重复此操作，直至所有样品全部加完。

💡 回收率提升技巧：若您的目标蛋白表达量偏低或结合力较弱，建议将收集到的全部流穿液再次加回柱中，重复过柱 1-2 次，以充分提高挂柱率。

3. 差异化洗杂（2 选 1）

待样品液体完全流尽后，请根据您的最终需求，选择以下一种洗杂方案：

✧ 方案 A（纯度优先——双重洗涤法）

Wash A 洗涤：加入 2 mL NovaPure™ Wash Buffer A 洗柱，待液体完全流尽。

Wash B 洗涤：再加入 2 mL NovaPure™ Wash Buffer B 洗柱，待液体再次完全流尽。

✧ 方案 B（得率优先——简易洗涤）

仅使用 Wash B：直接加入 2 mL NovaPure™ Wash Buffer B 洗柱，待液体完全流尽即可。

4. 目标蛋白洗脱

（1）更换收集管：待洗杂缓冲液完全流尽后，将纯化柱移入全新且干净的 1.5 mL 或 2.0 mL 离心管中。

（2）实施洗脱：向柱内加入 300 ~ 600 μL NovaPure™ Elution Buffer，收集自然流出的液体，此即为含有高浓度目标蛋白的洗脱液。

（3）二次洗脱与定量：为追求极限得率，可重复进行第二次洗脱。

第五章 ⚠️ 填料重复使用与风险提示

官方建议：为保障您的珍贵样本与实验数据的绝对可靠，我们强烈建议每次纯化均使用全新填料。尽管 NovaPure™ 填料具备极高的物理化学稳定性，理论上可针对同一目标蛋白重复使用，但多次使用会不可避免地带来以下风险：

- ✧ 得率与纯度断崖式下降：微球深部孔隙中会不可逆地残留变性蛋白与细胞碎片，严重占据有效结合位点。
- ✧ 交叉污染风险：上一次实验中残留的蛋白聚合物、杂带极易在下一次洗脱时脱落，毁掉您高纯度的最终产物。
- ✧ 流速衰减堵柱：残留的脂质和核酸会导致柱床板结，极大增加您的操作时间。

应急重复使用指南 若您的实验仅处于前期粗筛阶段（非最终获取高纯蛋白目的），且确需对完全相同的目标蛋白重复使用填料，请务必在当次纯化结束后立即进行以下再生操作：

（1）深度洗脱：使用至少 5 CV（柱床体积）的 NovaPure™ Elution Buffer 彻底冲洗，尽可能洗去残留的强结合杂蛋白。

（2）纯水置换：使用至少 5 CV 的超纯去离子水冲洗，彻底洗净残留的咪唑和盐离子。

（3）重新平衡：使用 5 CV 的 NovaPure™ Binding/Equilibration Buffer 重新平衡柱床，即可备用。

（注：即便经过标准清洗，填料载量仍会发生不可逆的衰减。建议在第二次使用时，适当增加

20%~30% 的填料用量或延长结合时间以作补偿。)

第六章 常见问题排查

现象	可能原因	建议措施
洗涤液中检出目标蛋白 (洗涤过强)	使用了 Wash A 但目标蛋白结合较弱；洗涤体积过大	改用 Wash B；将洗涤减至 5-8 CV；缩短每次洗涤的接触时间
洗脱液纯度低、杂带多	昆虫细胞内源组氨酸富集蛋白共洗脱；洗涤不足	改用 Wash A 或 B → A 串联；将洗涤增至 15 CV；下游补一步离子交换或分子筛
洗脱液中目标蛋白很少，柱上却有残留	标签部分包埋	洗脱前静置 10 min 再放流
柱床变白、流速正常但完全不挂柱	样品或缓冲液含 EDTA / EGTA，镍离子已被剥离	重新购置填料
流速极慢或柱床堵塞	样品未充分澄清；核酸未降解；填料被涡旋打碎	12,000 × g 离心 20 min 并过 0.45 μm 膜；加足核酸酶；仅用颠倒或旋转混匀，禁止涡旋
洗脱蛋白出现降解条带	裂解后蛋白酶持续作用；操作温度过高	样品准备与孵育全程 4 °C；加入 EDTA-free 蛋白酶抑制剂；缩短总操作时间
重复使用后载量明显下降	填料未按 8.2 完整再生；曾发生柱床干涸	执行完整再生；确认保存期间液面始终高于柱床
柱床出现分层或气泡	加样时冲击柱床；缓冲液温差过大	沿柱壁缓慢加液；缓冲液与柱温一致后再使用