

## His 标签蛋白纯化试剂盒说明书

产品编号: PTE006

保存温度: 2-8°C保存, 保质期一年, 切勿冷冻!

产品内容:

Components	PTE006-10T	保存
Ni-Agarose 介质 (50%) (切勿冷冻!)	5 mL	2-8°C
1 M 咪唑溶液	50 mL	RT
1 M Tris-HCl 溶液 (pH7.9)	30 mL	RT
5 M NaCl 溶液	30 mL	RT
洗涤液	125 mL	2-8°C
超声裂解缓冲液	30 mL	2-8°C
包涵体变性洗涤液	125 mL	2-8°C
尿素	15 g	RT
层析柱 (6 mL)	10 个	RT
PMSF 溶剂	1mL	RT
PMSF 干粉	10mg	RT
说明书	1 份	

产品说明:

本试剂盒是基于 Ni 亲和层析的蛋白质纯化方法进行 His 标签蛋白纯化的试剂盒; 变性和非变性条件均可使用, 也适用于纯化包涵体中的 His 标记蛋白。最大载量为 20-30 mg His 标记蛋白质/mL 介质。本试剂盒可满足 10 次 His 蛋白纯化 (50 mL 体积的细菌)。

实验准备:

第一次使用时把一管 PMSF 溶剂加入 PMSF 干粉中, 震荡溶解, 即配制成 PMSF (10 mg/mL) 溶液。配成 PMSF 溶液后需-20°C 保存。

## 操作步骤:

### 一、装柱

1. 将 Ni-Agarose 介质充分混匀后, 取适量加入到预放了一片筛板的层析柱中。

**注意:** 介质用量需要根据 His 蛋白产量决定, 请根据实验需要取适量的 Ni-Agarose 介质加入层析柱。

2. 用 5 倍柱体积 (指填料的体积, 下同) 自备去离子水洗柱, 共三次。

3. 用 5 倍柱体积的洗涤液洗柱, 共三次。

4. 室温 5,000 g 离心 10 min 收集 50 mL 表达菌液, 弃上清, 沉淀放冰上待用或放 -80°C 保存。最好用不加诱导物的菌液做对照。

**注意:** 以下成分均以 50 mL 菌液计算用量, 实际用量可根据菌体量增减。

### 二、裂解

1) **超声破碎细菌:** 加入 2.5 mL 冰浴的超声裂解缓冲液, 再加入 60  $\mu$ L PMSF (10 mg/mL) 溶液, 冰上超声裂解菌体直到在显微镜下看见绝大多数细胞破裂。超声参数需根据仪器型号自行摸索, 但裂解物必须不粘稠, 否则会堵塞层析柱。

2) **酶法裂解细菌:** 加入 2.5 mL 冰浴的酶解液, 再加入 60  $\mu$ L PMSF (10 mg/mL) 溶液, 震荡混匀, 冰上放置 30 分钟。4°C 下 13,000-15,000 g 离心 10 min, 去除残留细胞和细胞碎片以防堵柱, 收集上清, 留样做 SDS-PAGE 电泳对照。可溶的 His 蛋白在上清液中, 包涵体的 His 蛋白在沉淀中。

### 三、纯化

#### A 纯化可溶性 His 标记蛋白

1. 将上步得到的上清液上柱, 用层析柱的底端的盖子盖上, 让细菌裂解液和介质在 4°C 结合 0.5-12 h 后取掉盖子, 自然重力下让裂解液自然流出。

2. 用 10 倍柱体积洗涤液洗柱, 收集并保存穿透液 (含杂质或没被吸附的 His 标记蛋白, 可做 SDS-PAGE 电泳的对照)。

3. 按下表配置含不同浓度咪唑的洗脱液, 以确定 His 标签蛋白的最适洗涤液的咪唑浓度。按从低到高的顺序洗涤并收集样品, SDS-PAGE 电泳检测 His 标记蛋白所在的区域。

成分	洗脱液体积 2 mL	工作浓度
1 M Tris-HCl 溶液 (pH7.9)	40 $\mu$ L	20 mM
1 M 咪唑溶液	X $\mu$ L	Y mM
5 M NaCl 溶液	200 $\mu$ L	500 mM

自备去离子水	补足到 2 mL	-
--------	----------	---

**注意：**建议咪唑浓度梯度为：40、70、100、200、300、400、500 mM。

- 如已知咪唑洗脱浓度，可直接配置该浓度的洗脱液进行洗脱。
- 洗脱后，依次使用 10 倍柱体积的去离子水洗涤柱子，再用 3 倍柱体积的 20%乙醇平衡（乙醇要将填料浸没），最后堵住层析柱下端的漏口，4°C保存待下次使用。

### B 纯化包涵体中 His 标记蛋白

- 将包涵体沉淀重悬于 2 mL 包涵体变性洗涤液。冰浴 1 h 以使包涵体溶解，期间可轻柔摇晃几次。
- 室温 10,000 g 离心 20 min，沉淀为未溶解的包涵体。将上清（含溶解后的 His 标记蛋白）以自备的针头过滤器（0.45 μm）过滤。
- 将滤过液上柱，用层析柱底端的盖子盖上，让细菌裂解液和介质在 4°C 结合 0.5-12 h 后取掉盖子，自然重力下让裂解液自然流出。
- 用 10 倍柱体积包涵体变性洗涤液洗柱，收集并保存穿透液（含杂质或没被吸附的 His 标记蛋白，可做 SDS-PAGE 电泳的对照）。
- 按下表配置含不同浓度咪唑的变性洗脱液，以确定 His 标签蛋白的最适洗涤液的咪唑浓度。按从低到高的顺序洗涤并收集样品，SDS-PAGE 电泳检测 His 标记蛋白所在的区域。

成分	洗脱液体积 2mL	工作浓度
1 M Tris-HCl 溶液 (pH7.9)	40 μL	20 mM
1 M 咪唑溶液	X μL	Y mM
5 M NaCl 溶液	200 μL	500 mM
尿素（干粉）	0.96 g	8 M
自备去离子水	补足到 2 mL	-

### C 纯化已复性的包涵体蛋白

- 将可溶性蛋白溶液，按照纯化细胞裂解液中可溶性 His 标记蛋白操作。

#### 四、再生（自备试剂）

纯化相同的蛋白质可以纯化 5-7 次后再进行再生，再生的凝胶最好用于相同蛋白的纯化。凝胶最多再生 3-4 次，一次或多次再生后，凝胶的蛋白结合能力会有所下降，并且非特异性结合也会升高。

具体步骤如下：

1. 5 倍柱体积的去离子水洗柱一次。
2. 1 倍柱体积的 25%、50%、75%乙醇各洗柱一次。
3. 5 倍柱体积的 100%乙醇洗柱一次。
4. 1 倍柱体积的 75%、50%、25%乙醇各洗柱一次。
5. 2 倍柱体积的去离子水洗柱一次。
6. 2 倍柱体积的 200 mM EDTA (pH 8.0)，洗柱一次。
7. 5 倍柱体积的去离子水洗柱一次。
8. 3 倍柱体积的 50 mM NiSO<sub>4</sub> 洗柱一次。
9. 3 倍柱体积的非变性裂解液洗柱一次。
10. 加入 3 倍柱体积的去离子水洗柱一次。
11. 随后把凝胶存放在 20%乙醇中，4°C 保存。