

His 标签蛋白纯化试剂盒说明书

产品编号: PTE007-10T

保存温度: 本品分为 AB 包装。A 包: 2-8°C/RT (常温运输); B 包: -20°C。

产品内容:

Components		PTE007-10T	保存
A 包	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 (仅 I 型提供)	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
B 包	酶解液 (仅 II 型提供)	2.5 mL×10	-20°C
	PMSF (10 mg/mL)	1 mL	-20°C
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)。

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 μ 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 μ 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 μ L	20 mM
1 M 咪唑溶液	X μ L	Y mM
5 M NaCl 溶液	200 μ 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。

4. 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。

5. 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℃保存待下次使用。

B 纯化包涵体中 His 标记蛋白

1. 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。
2. 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。
3. 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℃结合 0.5-12 h 后取掉盖子，自然重力下让裂解液自然流出。
4. 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）。
5. 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

1. 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 NiSO₄ 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。