

His-Tagged Protein Purification Kit(Inclusion Body Protein)

His 标签蛋白纯化试剂盒（包涵体蛋白）

产品货号：26422（5ml）

产品简介：

该产品为镍柱纯化系统，对6×His-tag蛋白具有显著特异吸附能力，能够高效一步纯化带有6个组氨酸亲和标签的蛋白。该系统具有4个Ni²⁺螯合位点，较只有3个螯合位点的Ni-IDA结合Ni²⁺更为牢固，有效防止纯化过程中Ni²⁺脱落且增强对His标签蛋白的结合能力，提高纯化效率。较高的基团密度，大大提高了蛋白载量。该系统在天然或变性条件下，对来源于各种表达系统（如杆状病毒，哺乳细胞，酵母以及细菌）中的His标签蛋白，均有很好的纯化效果。本产品已螯合镍离子，可直接用于包涵体蛋白的纯化，使用方便，快捷。

支持物： CL-6B琼脂糖凝胶

载量： 20-30mg His标签蛋白/ml填料

粒径： 50-160μm

产品内容：

| 产品名称 | 包装 | 储存条件 |
|--------------------------------------|-------|------------|
| Ni-Agarose Resin | 5ml | 2-8°C，避免冷冻 |
| Bacterial Protein Extraction Reagent | 65ml | 室温 |
| Urea | 365g | 室温 |
| 1 M Tris-HCl (pH7.9) | 15ml | 室温 |
| 1 M Imidazole | 65ml | 室温 |
| 3 M NaCl | 120ml | 室温 |
| Protease Inhibitor Cocktail | 700μl | -20°C |
| Affinity Column (12 ml) | 1set | 室温 |

操作步骤：

I缓冲液的准备

包涵体蛋白纯化缓冲液配方：

| Component | Tris-HCl (pH7.9) | Imidazole | NaCl | Urea |
|----------------|------------------|-----------|------|------|
| Binding Buffer | 20mM | 5mM | 0.5M | 8M |
| Elution Buffer | 20mM | 500mM | 0.5M | 8M |

II组装层析柱

1. 将 Ni-Agarose Resin 填料混匀后加入层析柱，室温静置 10 分钟，待凝胶与溶液分层后，把底部的出液口打开，让乙醇通过重力作用缓慢流出。

注意：

- 1) 填料的上层是乙醇保护层，将填料和乙醇一起混匀，以每 ml 填料纯化 20-30mg His 标签蛋白计算，取需要的填料与乙醇的混合液加入层析柱。
- 2) 如果乙醇不流出，可以给柱子一个外力，例如用大拇指对柱口轻轻按压一下，迫使乙醇流出。
- 3) 本实验都是通过重力作用使溶液流出。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

2. 向装填好的柱中加入 5 倍柱体积的去离子水将乙醇冲洗干净后,再用 10 倍柱体积的 Binding Buffer 平衡柱子,平衡结束后即可上样。

注意: 柱体积指的是填料的体积。

III包涵体蛋白的纯化

1. 收集菌体后,每 100mg 菌体(湿重)加入 2ml 细菌裂解液(每 1ml 细菌抽提试剂中已加入 10 μ l 蛋白酶抑制剂混合物),超声裂解菌体。

注意:

1) 当提取物粘度高或提取蛋白为包涵体时,建议加入 DNase I 和 Lysozyme。每 1ml 细菌抽提试剂中加入 1 μ l DNase I (1,000 U/ml), 2 μ l Lysozyme (50 mg/ml)。

2) 超声过程中保持菌液处于冰浴中,超声条件依赖于所使用的超声仪功率,探头种类,容器的大小形状,需实验中自己摸索,应避免连续超声导致的大量产热,可分成短时间,多次超声,通过一定的间隔时间避免溶液过热。最终菌液变清即可。

2. 10,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C 离心 15 分钟,分离上清和沉淀,并收集沉淀。

3. 将沉淀重悬于 Binding Buffer 中,尽量混匀使包涵体充分溶解。

4. 10,000 \times g 离心 20 分钟,收集上清。

注意: 建议将离心后的上清以孔径为 0.22 μ m 或者 0.45 μ m 的滤膜过滤。

5. 将上清负载上柱,流速为 10 倍柱体积/小时,收集流穿液。

注意:

1) 本试剂盒中附带有一块筛板,使用时先将筛板加至填料的上层,再将处理好的上清负载上柱。该筛板可用于杂质较多的蛋白的过滤,防止过多的杂蛋白堵塞柱子,但是筛板放入柱子后不易取出。

2) 通过控制加入的上清(菌体裂解液)的速度来控制流速。

6. 使用 15 倍柱体积的 Binding Buffer 冲洗柱子,洗去杂蛋白。

7. 使用适量 Elution Buffer 洗脱,收集洗脱峰。

注意: 通过蛋白监测仪监测,洗脱峰可以分管收集,每 1ml 收集 1 管。

8. 洗脱后,依次使用 5 倍柱体积的 Binding Buffer, 5 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),封柱后 2-8 $^{\circ}$ C 保存。

注意:

1) 在纯化包涵体蛋白时,所有缓冲液均含有变性剂,可以降低 Binding Buffer 中的咪唑浓度(比 5mM 更低)。洗脱时,若蛋白在较高 pH 下洗脱失败,可以选用低 pH 缓冲液作为洗脱缓冲液(pH6.5, pH5.9 或 pH4.5)。

2) 如果是分段梯度洗脱,最大洗脱缓冲液中咪唑浓度未达到 500mM,则使用浓度为 500mM 的咪唑进行洗脱 10 倍柱体积后,再进行第 8 步的操作。

IV柱再生

当填料使用多次后,结合效率会有所下降(表现为流速变慢或填料失去蓝绿色),可以用以下方法再生,提高填料的使用寿命和蛋白质的结合效率。

1. 使用 2 倍柱体积的 6M 盐酸胍冲洗后,使用 3 倍柱体积的去离子水冲洗。

2. 使用 1 倍柱体积的 2% SDS 冲洗。

3. 依次使用 1 倍柱体积的 25%、50%、75%和 5 倍柱体积的 100%乙醇冲洗,再依次使用 1 倍柱体积的 75%、50%和 25%的乙醇冲洗。

4. 使用 1 倍柱体积的去离子水冲洗。

5. 使用 5 倍柱体积含 50mM EDTA 缓冲液(PH8.0)冲洗。

6. 使用 3 倍柱体积去离子水,3 倍柱体积 20%乙醇冲洗。

7. 2-8 $^{\circ}$ C 保存。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

8. 再次使用前，需首先使用 10 倍柱体积去离子水冲洗，然后使用 5 个柱体积的 50mM NiSO₄ 再生，3 个柱体积的 Binding Buffer 平衡。

注意事项：

1. 在纯化之前采用电泳检测蛋白的可溶性，本试剂盒只适合于包涵体蛋白的纯化。如需纯化可溶性蛋白，请选择我公司的可溶性蛋白纯化试剂盒，货号为：26421。
2. 缓冲液中不建议使用β-巯基乙醇、DTT 和 EDTA。
3. 整个纯化过程中切忌凝胶脱水变干。
4. 为提高纯化效率，首先确定 Binding Buffer 和 Elution Buffer 中 Imidazole（咪唑）的最佳使用浓度。必要时可以使用线性或梯度浓度的 Imidazole（咪唑）（10-500mM）洗脱蛋白，并通过 SDS-PAGE 或 Western Blotting 来检测目的蛋白的纯度。
5. 请使用高纯度的试剂配制缓冲液，并通过 0.22μm 或者 0.45μm 过滤器过滤。为避免柱子被堵塞，建议将裂解液进行离心，或者使用 0.22μm 或者 0.45μm 过滤器过滤。
6. 柱再生时，保证每步洗完后都要用足够的去离子水冲洗至中性。
7. 如果有些蛋白采用尿素的溶解效果不好，可以采用盐酸胍进行溶解。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>