**His-Tagged Protein Purification Kit (Soluble Protein)**

**His标签蛋白纯化试剂盒（可溶性蛋白）**

**产品货号：**26421（5ml）

**产品简介：**

 本试剂盒包含Ni-Agarose填料、亲和柱空柱以及可溶性His融合蛋白纯化所需的全部试剂（细菌裂解液、蛋白酶抑制剂混合物、结合缓冲液和洗脱缓冲液组分），使用方便。该镍柱纯化系统对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，可直接用可溶性蛋白的纯化，使用方便，快捷。

 **产品内容：**

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

 **操作步骤：**

 **Ⅰ缓冲液的准备**

可溶性蛋白纯化缓冲液配方：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Component | Tris-HCl（pH7.9） | Imidazole | NaCl |
| Soluble Binding Buffer | 20 mM | 10 mM | 0.5 M |
| Soluble Elution Buffer | 20 mM | 500 mM | 0.5 M |

**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。**

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可溶性蛋白的纯化**

1. 收集菌体后，每100 mg菌体（湿重）加入**1-5 ml细菌裂解液**（每1 ml 细菌抽提试剂中已加入10 μl 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1 ml 细菌抽提试剂中加入1 μl DNase I（1,000 U/ml），2 μl 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. 10000 rpm,4℃离心3分钟，收集上清中的可溶性蛋白。

3. 用Binding Buffer将菌体裂解液等倍稀释后负载上柱，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，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的作用。再将处理好的样品负载上柱，但是筛板放入柱子后 就不易取出。**

**2）通过控制加入的菌体裂解液的速度来控制流速。**

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

5. 使用适量Soluble Elution Buffer洗脱，收集洗脱峰。

 **注意：洗脱峰可以分管收集，每1 ml收集1管，并采用蛋白监测仪监测，收集洗脱峰**

6. 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），封柱后2-8℃保存。

 **注意：如果是分段梯度洗脱，最大洗脱缓冲液中咪唑浓度未达到500 mM时，则使用浓度为500 mM的咪唑进行洗脱10倍柱体积后，再进行第6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6 M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50 mM 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°C保存。

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50 mM 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，本试剂盒只适合于可溶性蛋白的纯化。

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中咪唑的最佳使用浓度。必要时可以使用线性或梯度浓度的咪唑浓度，Binding Buffer的范围为0-10 mM，洗脱缓冲液的范围为10-500 mM来进行。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。