

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： 20-30 mg His标签蛋白/ml填料

粒径： 50-160 μm

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
Urea	365 g	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

包涵体蛋白纯化缓冲液配方：

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



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

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719779

Q Q：807961520 731791866

邮箱：shsunbao@126.com

http://www.saint-bio.com

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 包涵体蛋白的纯化

1. 收集菌体后, 每 100 mg 菌体 (湿重) 加入 2 ml 细菌裂解液 (每 1 ml 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 1 ml 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 1 ml 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 5 mM 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 500 mM, 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 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 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。



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

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719779

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: shsunbao@126.com

http://www.saint-bio.com

5. 使用 5 倍柱体积分含 50 mM EDTA 缓冲液 (PH8.0) 冲洗。
6. 使用 3 倍柱体积分去离子水, 3 倍柱体积分 20%乙醇冲洗。
7. 2-8° C 保存。
8. 再次使用前, 需首先使用 10 倍柱体积分去离子水冲洗, 然后使用 5 个柱体积分的 50 mM NiSO₄再生, 3 个柱体积分的 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) (10-500 mM) 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 0.22 μ m 或者 0.45 μ m 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 0.22 μ m 或者 0.45 μ m 过滤器过滤。
6. 柱再生时, 保证每步洗完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
免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719779
Q Q: 807961520 731791866
邮箱: shsunbao@126.com
<http://www.saint-bio.com>