

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 Ni^{2+} 螯合位点，较只有 3 个螯合位点的 Ni-IDA 结合 Ni^{2+} 更为牢固，有效防止纯化过程中 Ni^{2+} 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。

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
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	20mM	10mM	0.5 M
Soluble Elution Buffer	20mM	500mM	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。



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 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 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. 10000 rpm, 4 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ 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。



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

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 0.22 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，保证每步洗完后都要用足够的去离子水冲洗至中性。



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>