



His-Tagged Protein Purification Kit (Soluble Protein)

His标签蛋白纯化试剂盒 (可溶性蛋白)

Cat. No. CW0894S (5 mL)

保存条件：Protease Inhibitor Cocktail, $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$; 其他组分, $2-8^{\circ}\text{C}$ 。

产品内容

Component	CW0894S 5 mL
Ni-Agarose Resin	5 mL
Bacterial Protein Extraction Reagent	65 mL
1 M Tris-HCl (pH7.9)	15 mL
1 M Imidazole	65 mL
3 M NaCl	120 mL
Protease Inhibitor Cocktail	700 μL
Affinity Column (12 mL)	1 set

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。

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**

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，如需纯化包涵体蛋白，请选择我公司的包涵体蛋白纯化试剂盒，货号为**CW0893**。
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**10-500mM**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。

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**100mg**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**)，**DNase I**和**Lysozyme**可单独从我们公司购买，货号: **Lysozyme(#CW0887S)**、**DNase I (#CW2090S)**，如使用其它公司产品，请按照相应说明书操作。

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°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脱柱子, 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°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°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 MnSO_4 再生, 3个柱体积的Binding Buffer平衡。