



# His-Tagged Protein Purification Kit (Inclusion Body Protein)

## His标签蛋白纯化试剂盒（包涵体蛋白）

Cat. No. CW0893S (5 mL)

### 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Ni<sup>2+</sup>螯合位点，较只有3个螯合位点的Ni-IDA结合Ni<sup>2+</sup>更为牢固，有效防止纯化过程中Ni<sup>2+</sup>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

### 保存条件

Protease Inhibitor Cocktail, -20±5°C; 其他组分, 2-8°C。

## 产品内容

Component	CW0893S
	5 mL
Ni-Agarose Resin	5 mL
Bacterial Protein Extraction Reagent	65 mL
Urea	365 g
1 M Tris-HCl (pH7.9)	15 mL
1 M Imidazole	65 mL
3 M NaCl	120 mL
Protease Inhibitor Cocktail	700 $\mu$ L
Affinity Column (12 mL)	1 set

## 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CW0894。
2. 缓冲液中不建议使用 $\beta$ -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  $\mu$ m或者0.45  $\mu$ 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  $\mu$ m或者0.45  $\mu$ 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。
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。

## 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	8 M
Elution Buffer	20 mM	500 mM	0.5 M	8 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20-30 mg 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8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细菌裂解液中请预先加入10  $\mu$ L蛋白酶抑制剂混合物），如有需要可以超声裂解菌体。  
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  $\mu$ L DNase I (1,000 U/ml)，2  $\mu$ L Lysozyme (50 mg/ml)，DNase I和Lysozyme可单独从我公司购买，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. 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×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 μm或者0.45 μm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: 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。

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℃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 NiSO<sub>4</sub>再生, 3个柱体积的Binding Buffer平衡。