天净沙系列

CAT#:220542

常温运输及保存，部分低温

天净沙

His 标记蛋白质微量纯化试剂盒

His-Tagged Protein Mini-Purification Kit

使用手册 V1.01

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

基于组氨酸-镍 (His-Ni) 亲和层析的蛋白质纯化方法是目前分离纯化重组表达蛋白质的重要方法，本产品就是专门用于上述实验的一站式产品，具有下列特点：

1. 一站式套装，含所需的镍柱介质、上柱液、洗柱溶液和层析柱，用户只需要提供表达 His 蛋白的细菌（酵母、杆状病毒、培养细胞）即可，非常方便。
2. 一次过柱即可获得纯度高达 95%的 His-标记蛋白。
3. 可在变性和非变性条件使用。
4. 每次可以处理 20 mL 的表达菌液，适合初步筛选和鉴定。
5. 提供 4 mL 浓度为 50%的 Ni-Agarose 介质，其最大载量为 20-30 mg His 标记蛋白质/mL 介质。本介质可以反复使用。
6. 本产品只能科研使用。

规格及成分

本产品采用小扁盒包装

成份	编号	规格	包装
1 M 咪唑溶液	220542a	25 mL	30 mL 本色瓶
1 M Tris-HCl 溶液，pH 7.9	220542b	25 mL	30 mL 本色瓶
5 M NaCl 溶液	220542c	25 mL	30 mL 本色瓶
溶菌酶+核酸酶（3：1：1）	220542d	50 mg	0.5 mL 红盖管
镍柱介质，50%	220542e	4 mL	5 mL 本色瓶
盐酸胍干粉	50-01-1	6 g	10 mL 本色瓶
尿素干粉	57-13-6	20 g	30 mL 本色瓶
PMSF 溶液（10 mg/mL）	100833	0.5 mL	0.5 mL 白盖管
亲和层析柱，6 mL	110809	1 套	自封袋
使用手册	220542sc	1 份	无

运输及保存

大部分试剂均可常温运输和保存，但镍柱介质长期需 4℃保存，溶菌酶+核酸酶和 PMSF 溶液需低温运输，-20℃保存，有效期一年。

自备试剂

去离子水、20%乙醇、针头过滤器（0.45 μm）。

使用方法

1. 将镍柱介质充分混匀后，取适量加入到预放了一片筛板的层析柱中（镍柱介质用量需要根据 His 蛋白产量决定，其最大载量为 20-30 mg His 标记蛋白质/mL 介质，请根据实验需要取适量的镍柱介质加入层析柱）。
2. 用 5 倍柱体积（指镍柱介质的体积，下同）自备去离子水洗柱，共三次。
3. 用 5 倍柱体积的新配结合液洗柱（配方如下，以 10 mL 为例），共三次：

成分	用量	在结合缓冲液中的浓度
1 M Tri-HCl（pH 7.9）	0.2 mL	20 mM

1 M 咪唑溶液	0.1 mL	10 mM
5 M NaCl 溶液	1 mL	500 mM
自备去离子水	8.7 mL	-

4. 室温 5000×g 离心 10 分钟收集 20 mL 表达菌液，弃上清，沉淀（约 100 mg）放冰上待用或放-80℃保存。最好用不加诱导物的菌液做对照样。
5. 如果超声破碎细菌：加入 1 mL 冰浴的结合液（1 mL 菌液需要用 50 μL 结合液），再加入 25 μL PMSF（10 mg/mL）溶液，冰上超声裂解菌体直到在显微镜下看见绝大多数细胞破裂。超声参数需根据仪器型号自行摸索，但裂解物必须不粘稠，否则会堵塞层析柱。如果酶法裂解细菌：加入 1 mL 冰浴的含溶菌酶的结合液（先取 20 mL 结合液，加入所有 50 mg 溶菌酶-核酸酶干粉，溶解后分装成 1 mL/管，剩余的-20℃放置），再加入 25 μL PMSF（10 mg/mL）溶液，冰上放置 30 分钟。
6. 4℃下 13000-15000×g 离心 10 分钟，去除残留细胞和细胞碎片以防堵柱，收集上清，留样做 SDS-PAGE 电泳对照。如果要纯化裂解液中可溶部分的 His 标记蛋白，则直接进入第 7 步；如果要纯化裂解液中包涵体（沉淀部分）中的 His 标记蛋白，则直接进入第 12 步。

A、纯化细胞裂解液中可溶部分的 His 标记蛋白

7. 将上步得到的上清液上柱，让重力使裂解液自然流出。如要提高 His 标记蛋白与介质的结合效率，可用试剂盒提供的红盖将层析柱下的漏液口堵上，让细菌裂解液和介质在 4℃结合 30 分钟或过夜。
8. 用 10 倍柱体积结合液洗柱（配方见上表），收集并保存穿透液（含杂质或没被吸附的 His 标记蛋白，可做 SDS-PAGE 电泳的对照）。
9. 如果用一步式洗脱法（适合已经找到最佳咪唑浓度的情况），则直接用适量的新鲜配制的洗脱液洗柱，收集并保存穿透液（含 His 标记蛋白）。洗脱液的配方如下（以 1 mL 体积和最佳咪唑浓度是 500 mM 为例）：

成分	用量	在洗脱液中的浓度
1 M Tri-HCl (pH 7.9)	20 μL	20 mM
1 M 咪唑溶液	500 μL	500 mM
5 M NaCl 溶液	100 μL	500 mM
自备去离子水	380 μL	-

10. 如果用多步式洗脱（适合不知道最佳咪唑浓度或一步式洗脱杂质多的情况），则按上表配制一系列咪唑浓度不同（如 40、60、100、200、300 和 500 mM），其

他成分浓度不变的洗液，按从低到高的顺序洗涤并收集样品，SDS-PAGE 电泳检测 His 标记蛋白所在的区域。

11. 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），最后堵住层析柱下端的漏口，4℃保存待下次使用。

B、纯化包涵体中 His 标记蛋白

12. 将第 6 步离心得到的包涵体沉淀重悬于 1-3 mL 含盐酸胍结合液中或 1-3 mL 含尿素结合液中（建议优先使用尿素做变性剂，因为得到的洗脱液可以直接跑 SDS-PAGE，而用盐酸胍的洗脱液需先除盐后才能电泳）。冰浴 1 小时以使包涵体溶解，期间可轻柔摇晃几次。含变性剂的结合液配方如下（以 10 mL 为例）：

成分	含盐酸胍结合液	含尿素结合液
1 M Tri-HCl（pH 7.9）	200 μL	200 μL
5 M NaCl 溶液	1 mL	1 mL
盐酸胍（MW=95.6）	5.7 g	无
尿素（MW=60.1）	无	4.8 g
自备去离子水	加水到 10 mL	加水到 10 mL

13. 室温 10000×g 离心 20 分钟，沉淀为未溶解的包涵体。将上清（含溶解后的 His 标记蛋白）以自备的针头过滤器（0.45 μm）过滤。

14. 将滤过液上柱，后续纯化步骤同第 7-第 11 步。只是所用结合液和洗脱液均含变性剂，含变性剂的洗脱液配方见下表（以 1 mL 为例）：

成分	含盐酸胍洗脱液	含尿素洗脱液
1 M Tri-HCl（pH 7.9）	20 μL	20 μL
1 M 咪唑溶液	500 μL	500 μL
5 M NaCl 溶液	100 μL	100 μL
盐酸胍（MW=95.6）	0.57 g	无
尿素（MW=60.1）	无	0.48 g
自备去离子水	补水到 1 mL	补水到 1 mL

注意事项

整个实验需避免含巯基乙醇、DTT 和 EDTA 等成分。若洗脱液不能将 His 标记蛋白洗脱下来，可改用 pH 6.5-4.5 的 pH 递减的 Tris-HCl 洗脱。