

## 可溶性蛋白纯化 (His-标签, Ni-NTA 柱法) 试剂盒 (非变性)

名称: 可溶性蛋白纯化 (His-标签, Ni-NTA 柱法) 试剂盒 (非变性)

英文名称: His-labeled protein Purification (NI-NTA column) kit (Native)

目录号: QYP1062

保存条件: 室温 (15-25°C), 4°C

保质期: 1 年

包含试剂:

名称	英文名称	规格	规格	保存条件
His-标签蛋白纯化亲和层析预装柱	<i>His- label protein purification filler</i>	1ml	5ml	4°C
平衡液	Balance Buffer	>50ml	>200ml	室温
洗涤液	Wash Buffer	>10ml	>50ml	室温
洗脱液	Elution Buffer	>10ml	>50ml	室温

赠送凝胶保护液 1 瓶 (约 100ml, 20%PBS 乙醇溶液, 4°C)

产品介绍:

His-标签蛋白纯化 (Ni-NTA 柱法) 试剂盒用于实验室的 His 标签融合蛋白纯化。本试剂盒预装柱, 我们已经给填装好, 客户可直接使用。

表达菌株经 IPTG 诱导表达蛋白、超声破碎、离心分离后的上清, 流经 His-标签蛋白纯化填料柱, 样本中的 His 标签蛋白与纯化填料特异性结合, 其他杂蛋白则不与柱子结合。样本经洗涤液洗涤除杂后, 加入洗脱液, 洗脱 His 标签蛋白。单次蛋白纯化得率因蛋白种类、蛋白分子量大小而异。每根 Ni-NTA 琼脂糖凝胶柱可反复使用 8-10 次, 其 His 标签蛋白结合效率不会显著降低。

本试剂盒中的 His-标签蛋白纯化填料可兼容 8M 尿素和 6M 盐酸胍, 亦可进行包涵体蛋白纯化。如需进行包涵体蛋白纯化, 请购买

包涵体蛋白纯化 (His-标签, Ni-NTA 柱法) 试剂盒 (变性) (QYP1063)。如需蛋白纯化试剂补充, 请购买可溶蛋白纯化 (His-标签, Ni-NTA 柱法) 试剂盒 (非变性) 补充装 (QYP1064)。

实验例:

实验名称: 可溶性 His-标签蛋白纯化

## I. 大肠杆菌中可溶性 His 标签蛋白的诱导表达

1. 挑取表达菌株单克隆，接种到 5ml 含抗生素的 LB 培养基中，培养过夜。
2. 按照 1: 50-1: 100 的比例，取培养过夜的菌液，接种到 100ml 含抗生素的 LB 培养基中。
3. 将菌液在 37℃ 恒温摇床震荡培养 1h 左右，至菌液的 OD600 达到 0.8-1.0。
4. 加入 1mM IPTG，继续培养 4-5h。
5. 收集菌液至离心管中，4000g 离心 10min，弃上清，收集菌体，-20℃ 或 -80℃ 冻存备用。

注：可在诱导表达前取出少量菌液，不加 IPTG，同样培养 4-5h 后作为未诱导的对照。对于特定蛋白的诱导表达，需通过实验确定最佳的 IPTG 浓度、诱导温度、诱导时间。

## II. 菌体的超声破碎

将菌体解冻，加入 10ml PBS，吹打混匀，充分重悬菌体。可在混悬液中添加 IPTG 及蛋白酶抑制剂。将菌体混悬液置于冰水混合物中，放入超声破碎仪，使探头浸入菌体混悬液液面下。将超声破碎仪调节至功率 200-300w，工作 10s，间隔 10s，共 6 个循环。开始超声。

P. S. 因不同实验室超声破碎仪型号、探头大小、裂解菌体量不同，上述实验条件仅供参考。客户需自行优化最适实验条件。如超声后菌液依然非常浑浊，应适当增加功率，延长超声时间。

超声破碎结束后，10000g，4℃ 离心 20min。将上清与沉淀分开保存。SDS-PAGE 电泳检测。确定蛋白是可溶性（上清）表达还是包涵体（沉淀）表达。

## III. His 蛋白的非变性纯化

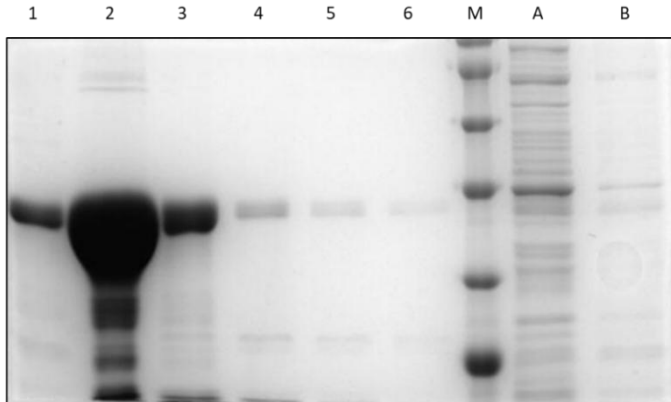
1. 装柱：将 His-标签蛋白纯化填料混匀。将下层筛板置于层析柱空柱底部。用剪开枪头尖的 1ml 枪头吸取 2ml His-标签蛋白纯化填料混悬液，加入层析柱空柱。待液体流出后（柱床体积 1ml），向层析柱中加入 PBS，将上层筛板置于层析柱顶部，小心向下推直到接触凝胶表面，压实。筛板和凝胶层之间不要有气泡。
2. 平衡：用平衡液洗柱子 10 个柱床体积。
3. 加样：将上清上柱。接住流穿液，反复上柱 2-3 次，使 His 标签蛋白与蛋白纯化填料充分结合。

P. S. 上清必须保持澄清，不能含有任何不可溶杂质。否则会堵柱子，影响纯化获得蛋白的纯度。若杂质较多，可 10000g，4℃，10min 离心 1-2 次，经滤纸过滤，再经 0.45um 滤器过滤。

5. 洗涤：用洗涤液洗柱子 10 个柱床体积。
6. 洗脱：用洗脱液洗脱目的蛋白 5-10 个柱床体积。将样本收集到 1.5ml 或 2ml EP 管中。
7. 再生：用平衡液洗柱子 10 个柱床体积。
8. 保存：使用后的柱子应加入 20%乙醇-PBS，盖上上下盖，直立保存在 4℃。

9. 洗脱下来的蛋白可用 BCA 蛋白定量试剂盒和 SDS-PAGE 电泳鉴定其浓度和纯度。

实验结果举例：



His 标签重组蛋白纯化

蛋白：His-PAG

1-6: 蛋白洗脱 1-6 管

A. 样本上柱流穿液

B. 洗涤液