



# His-Tagged Protein Purification Kit (Soluble Protein)

## His标签蛋白纯化试剂盒（可溶性蛋白）

**目录号：** CW0894S（5 ml）

**保存条件：** Protease Inhibitor Cocktail, -20℃； Ni-Agarose Resin, 2-8℃， 避免冷冻；  
其它组分, 2-8℃

### 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 $\mu$ l
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10-500 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 μm或者0.45 μm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 μm或者0.45 μm过滤器过滤。
6. 柱再生时，保证每步洗完时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  $\mu$ 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  $\mu$ 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. 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℃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℃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。

本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及其它用途