

## HIS标签蛋白纯化试剂盒

**产品货号:** H1032

**储存条件:** 4°C 保存

### 产品组分

货号	组分	规格
N30210	Ni NTA Beads 6FF	10ml
H1032A	Lysis buffer	200ml
H1032B	washing buffer	200ml
H1032C	elution buffer	50ml
H1032D	溶菌酶	100mg
AC003	3ml AC 层析空柱	2 套
AC012	12ml AC 层析空柱	2 套
AC030	30ml AC 层析空柱	1 套

### 产品简介

His 标签蛋白纯化试剂盒 (His-tag Protein Purification Kit), 或者镍柱试剂盒, 是一种可以兼容高浓度变性剂(8M 尿素或 6M 盐酸胍), 简单、快速、灵活、高效并且高特异性地在非变性条件下纯化 His 标签蛋白的试剂盒。本试剂盒中包含了 His 标签蛋白所需的相关试剂和亲和层析柱空柱管, 为 His 标签蛋白的纯化带来了极大的便利。

本试剂盒用于非变性条件纯化 His 标签蛋白, 试剂盒中提供非变性 His 标签蛋白纯化所需的裂解液、洗涤液和洗脱液, 可以很好地满足实验的需要。

### 注意事项:

- 1、试剂盒中的 Ni NTA Beads 6FF 体积 10ml 为纯 beads 体积, 总体积 20ml (保护液为 20%乙醇溶液) 使用前需要充分混合均匀;
- 2、对于包涵体蛋白的纯化, 在采用 8M 尿素或 6M 盐酸胍溶解蛋白的情况下, 需通过透析去除尿素和盐酸胍后才能使用本产品进行 His 标签蛋白的纯化。
- 3、请勿在-20°C 或更低温度冷冻保存 Ni NTA Beads 6FF。
- 4、若离心不能完全除去蛋白样品中的不溶物, 可以将样品溶液用 0.45μm 的滤膜过滤。
- 5、若使用本说明书提供的条件无法达到理想的纯化效果, 可尝试改变洗涤液和洗脱液中咪唑的浓度和(或)pH, 以达到最优效果。
- 6、为了安全您请穿实验服戴一次性手套操作。

### 说明:

对于用镍柱纯化大肠杆菌中 His 标签蛋白比较熟悉的使用者可参考“4. 简化的操作流程”。

本说明书以最常见的大肠杆菌中表达纯化 His 标签重组蛋白为例, 说明使用方法。在其它体系中表达时, 请参考该表达体系的相关使用说明, 可借鉴大肠杆菌中纯化 His 标签重组蛋白的使用说明

### 实验步骤

1. 大肠杆菌中可溶性 His 标签重组蛋白的诱导表达:

以最常用的 IPTG 诱导表达系统为例, 诱导表达条件的优化可参照所使用的诱导表达体系的说明。其它诱导表达系统请参考适当的使用说明进行。

a. 挑取表达 His 标签重组蛋白的单克隆, 接种到 3ml 或 10-20ml 含适当抗生素的 LB 培养液中, 培养过夜。

b. 按照 1:20 的比例取培养过夜的菌液, 接种到预热至 37°C 并含适当抗生素的 LB 培养液中。如取 5ml 培养过夜的菌液接种到 100ml 预热至 37°C 并含适当抗生素的 LB 培养液中。具体的培养体积视需要纯化的蛋白量而定, 初步的鉴定培养 3-10ml 即可; 常规的表达纯化, 通常可考虑培养 100-200ml; 制备型的纯化, 培养体积可以达到 1L 或更大。如果希望取得更好的表达效果, 建议按照 1:100 的比例接种过夜培养的菌液, 但后续培养至相应的 OD 值需要更长的时间。

c. 37°C 常规培养约 30-60min 或更长时间, 至菌液的 OD<sub>600</sub> 达到 0.5-0.7, 并且 OD<sub>600</sub> 最好接近 0.6。

d. 加入 IPTG 至终浓度为 1mM, 继续培养 4-5 小时。

注: 可以在加入 IPTG 前取出少量菌液同样培养 4-5 小时后作为未诱导的对照, 也可以在加入 IPTG 前直接取出少量菌液作为未诱导的对照。对于特定蛋白的诱导表达, 最佳的 IPTG 浓度、诱导温度、和诱导时间需通过实验确定。

e. 收集菌液至离心管中, 4°C 4,000g 离心 20min 或 4°C 15,000g 离心 1min, 弃上清, 收集沉淀。随后即可进入细菌裂解步骤, 也可在-20°C 或-80°C 冻存备用。冷冻保存的菌体使用前需置于冰上解冻 15min。



## 2. 非变性条件下 His 标签蛋白的小量纯化:

此法常用于小量样品的快速分析和鉴定

a. 接步骤 1(e), 离心收集 1ml 菌液的细菌沉淀并弃上清, 加入 100 $\mu$ l Lysis buffer, 将细菌沉淀充分重悬于裂解液中, 可进行轻微的 vortex(尽量避免产生气泡)。

注: 根据 His 标签重组蛋白表达的丰度, 菌液和裂解液的体积比可以在 25:1-5:1 范围内适当调整。

表达丰度非常高时, 每毫升菌液沉淀可以加入 200 $\mu$ l Lysis buffer; 表达丰度非常低时, 每毫升菌液沉淀可以加入 40 $\mu$ l Lysis buffer。试剂盒中裂解液可以确保裂解绝大多数可溶性蛋白和包涵体蛋白, 裂解后可以直接用于 SDS-PAGE。如有必要, 可在裂解细菌之前, 在裂解液中添加适量的蛋白酶抑制剂混合物。

b. 加入溶菌酶至 1mg/ml 并轻轻混匀, 尽量避免产生气泡, 冰水浴或冰上放置 30min。注: 溶菌酶可以用裂解液配制成 100mg/ml 的母液, 临使用前加入。溶菌酶配制成母液后, 可以适当分装后-20 $^{\circ}$ C 保存。

c. 轻轻 vortex 数下, 以充分裂解细菌, 尽量避免产生气泡。

d. 4 $^{\circ}$ C 离心(15000g $\times$ 10min), 取 10 $\mu$ l 上清留样作后续检测用, 收集余下上清至一新的洁净离心管中。

e. 加入 20 $\mu$ l 混合均匀的 Ni NTA Beads 6FF, 4 $^{\circ}$ C 在摇床上缓慢摇动 30min, 以充分结合带 His 标签的目的蛋白。

注: 缓慢摇动 30min 已经可以确保蛋白充分结合, 但可以根据时间安排的需要缓慢摇动更长时间甚至缓慢摇动过夜。根据经验, 直接使用 Ni NTA Beads 6FF 也能获得良好的纯化效果。但如希望获得更高的标签蛋白得率, 可以参考步骤 3f, 用一个柱体积的 Lysis buffer 平衡 Ni NTA Beads 6FF 2-3 次。

f. 4 $^{\circ}$ C 离心(1000g $\times$ 10s)沉淀凝胶, 取 20 $\mu$ l 上清留样作后续检测用, 其余上清弃去。

g. 加入 40 $\mu$ l washing buffer 重悬凝胶, 4 $^{\circ}$ C 离心(1000g $\times$ 10s), 取 20 $\mu$ l 上清留样作后续检测用, 其余上清弃去。

h. 重复步骤 g, 再进行一次洗涤。

i. 加入 20 $\mu$ l elution buffer, 轻轻重悬凝胶。4 $^{\circ}$ C 离心(1000g $\times$ 10s), 收集上清及凝胶。上清即为纯化获得的带有 His 标签的目的蛋白。

j. 重复步骤 i 两次。共洗脱收集约 60 $\mu$ l 纯化的蛋白样品。

## 3. 非变性条件下 His 标签蛋白的大量纯化:

a. 接步骤 1(e), 对于新鲜的或解冻的细菌沉淀, 按照每克细菌沉淀湿重加入 4ml(2-5ml 均可) Lysis buffer 的比例加入裂解液, 充分重悬菌体。如有必要, 可以在裂解细菌之前, 在裂解液中添加适量的蛋白酶抑制剂混合物。

b. 加入溶菌酶至终浓度为 1mg/ml 并混匀, 冰水浴或冰上放置 30min。注: 溶菌酶可以用裂解液配制成 100mg/ml 的母液, 临使用前加入。溶菌酶配制成母液后, 可以适当分装后-20 $^{\circ}$ C 保存。

c. 冰上超声裂解细菌。超声功率 200-300W, 每次超声处理 10s, 每次间隔 10s, 共超声处理 6 次。

注: 具体超声处理的方式须根据特定型号的超声仪器自行摸索和优化。

d. (可选做)如超声处理后裂解液非常粘稠, 可以加入 RNase A 至 10 $\mu$ g/ml 及 DNase I 至 5 $\mu$ g/ml, 冰上放置 10-15min。或者使用适当的装好了较细针头的注射器, 反复抽吸数次以剪切粘稠的基因组 DNA 等。

e. 4 $^{\circ}$ C 10,000g 离心 20-30min, 收集细菌裂解液上清并置于冰水浴或冰上。可以取 20 $\mu$ l 上清留作后续检测用。

注: 上清必须保持澄清(即不含任何不溶物), 才能进行下一步的纯化。上清中如混有不溶性杂质会严重影响后续纯化获得蛋白的纯度。

f. 取 1ml 混合均匀的 Ni NTA Beads 6FF, 4 $^{\circ}$ C 离心(1000g $\times$ 10s)弃去储存液, 向凝胶中加入 0.5ml Lysis buffer 混匀以平衡凝胶, 4 $^{\circ}$ C 离心(1000g $\times$ 10s)弃去液体, 再重复重复平衡 1-2 次, 弃去液体。将约 4ml 细菌裂解液上清加入其中, 4 $^{\circ}$ C 在侧摆摇床或水平摇床上缓慢摇动 60min。

注: Ni NTA Beads 6FF 也可不平衡直接使用, 但蛋白的得率有可能会有 5-20% 的下降。

g. 将 Lysis buffer 和 Ni NTA Beads 6FF 的混合物装入试剂盒提供的亲和层析柱空柱管中。

注: 也可先取 1ml 混合均匀的 Ni NTA Beads 6FF 装柱, 然后用 0.5ml Lysis buffer 平衡 2-3 次后加入约 4ml 细菌裂解液上清, 后续可以将穿流液收集后重复上柱 3-5 次以充分结合目的蛋白。先混合后装柱的方式操作起来相对麻烦, 但更有利于带有 His 标签重组蛋白与镍柱的充分结合, 特别是当 His 标签被蛋白本身部分遮挡或 His 标签重组蛋白浓度很低时与镍柱的结合效率会高一些。





h. 将纯化柱底部的盖子打开，在重力作用下使柱内液体流出，收集约 20 微升穿流液作后续分析用。

i. 洗柱 5 次，每次加入 0.5-1ml washing buffer，每次均收集约 20 微升穿柱的洗涤液用于后续的分析检测用。洗柱及下一步洗脱过程中可以用 Bradford 法检测每次洗涤液和洗脱液中的蛋白含量，从而考虑增加或减少洗涤和洗脱的次数。

**注：**如果出现后续获得蛋白纯度不够高的情况，可以再增加洗柱次数 2-3 次。

j. 洗脱目的蛋白 6-10 次，每次用 0.5ml elution buffer。将每次的洗脱液分别收集到不同的离心管中。收集获得的洗脱液即为纯化的 His 标签蛋白样品。

#### 4. 简化的操作流程：

a. 细菌中的目的蛋白诱导表达后，离心沉淀细菌。

b. 每克细菌沉淀湿重加入 4ml Lysis buffer，可添加适量蛋白酶抑制剂，充分重悬细菌。

c. 加入溶菌酶至终浓度为 1mg/ml 并混匀，冰水浴或冰上放置 30min。

注：溶菌酶可以用裂解液配制成 100mg/ml 的母液，临使用前加入。

溶菌酶配制成母液后，可以适当分装后 -20°C 保存。

d. 冰上超声裂解细菌，离心取上清。

e. Ni NTA 6FF 装柱，1ml Lysis buffer 平衡纯化柱 2 次。

f. 步骤 4d 中的上清上柱。

注：上清上柱是可以收集穿流液并重复上柱 3-5 次，以充分结合 His 标签蛋白。

g. 用 0.5ml washing buffer 洗柱 5 次。

注：如果出现咪唑浓度偏低的情况，可以自行添加适量咪唑，如果出现咪唑浓度偏高的情况，可以使用试剂盒提供的 Lysis buffer 作为洗涤液使用。

h. 用 0.5ml elution buffer 洗脱 6-10 次。

