

天
净
沙
系
列

CAT#: 100102-2
常温运输, 有 4 个低温成分

TIANDZ

一站式 His 标记蛋白质微量纯化套装

One-Stop His-Tagged Protein Miniprep Pack

使用手册 V1.8

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

<p>产品及特点</p>	<p>基于 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：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 一站式套装，含所需的介质、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. 专一性强，一次过柱即可获得纯度高达 95% 的 His-标记蛋白。 3. 变性和非变性条件均可使用，也适用于纯化包涵体中的 His 标记蛋白。 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。 6. 介质为 CL-6B 琼脂糖，含四个 Ni 离子螯合基团，比只有四个 Ni 离子螯合基团的 Ni-IDA 更有效。 7. 本介质可以反复使用多次。 																																						
<p>规格及成分</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>编 号</th> <th>小扁盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ni-Agarose 介质，50%</td> <td>100102</td> <td>4 mL</td> </tr> <tr> <td>1 M 咪唑溶液</td> <td>100102a</td> <td>25 mL</td> </tr> <tr> <td>1 M Tris-HCl 溶液，pH7.9</td> <td>100102b</td> <td>25 mL</td> </tr> <tr> <td>5 M NaCl 溶液</td> <td>25-06290</td> <td>25 mL</td> </tr> <tr> <td>溶菌酶 (20KU/mg)</td> <td>80103c</td> <td>30 mg(黄盖)</td> </tr> <tr> <td>Benzonase 溶液 (2U/uL)</td> <td>100102c</td> <td>20 uL(红盖)</td> </tr> <tr> <td>盐酸胍</td> <td>50-01-1</td> <td>6 g</td> </tr> <tr> <td>尿素</td> <td>57-13-6</td> <td>20 g</td> </tr> <tr> <td>PMSF 溶液 (10mg/mL)</td> <td>100833</td> <td>0.5 mL(白盖)</td> </tr> <tr> <td>亲和层析柱，6 mL</td> <td>110809</td> <td>1 套</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>1 份</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成份	编 号	小扁盒包装	Ni-Agarose 介质，50%	100102	4 mL	1 M 咪唑溶液	100102a	25 mL	1 M Tris-HCl 溶液，pH7.9	100102b	25 mL	5 M NaCl 溶液	25-06290	25 mL	溶菌酶 (20KU/mg)	80103c	30 mg(黄盖)	Benzonase 溶液 (2U/uL)	100102c	20 uL(红盖)	盐酸胍	50-01-1	6 g	尿素	57-13-6	20 g	PMSF 溶液 (10mg/mL)	100833	0.5 mL(白盖)	亲和层析柱，6 mL	110809	1 套	使用手册	1 份	1 份
成份	编 号	小扁盒包装																																					
Ni-Agarose 介质，50%	100102	4 mL																																					
1 M 咪唑溶液	100102a	25 mL																																					
1 M Tris-HCl 溶液，pH7.9	100102b	25 mL																																					
5 M NaCl 溶液	25-06290	25 mL																																					
溶菌酶 (20KU/mg)	80103c	30 mg(黄盖)																																					
Benzonase 溶液 (2U/uL)	100102c	20 uL(红盖)																																					
盐酸胍	50-01-1	6 g																																					
尿素	57-13-6	20 g																																					
PMSF 溶液 (10mg/mL)	100833	0.5 mL(白盖)																																					
亲和层析柱，6 mL	110809	1 套																																					
使用手册	1 份	1 份																																					
<p>运输及保存</p>	<p>常温运输和保存，但介质长期需 4℃ 保存，溶菌酶、Benzonase 溶液和 PMSF 溶液需 -20℃ 保存，有效期一年</p>																																						
<p>自备试剂</p>	<p>去离子水、20%乙醇、针头过滤器 (0.45 μm)</p>																																						
<p>使用方法</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 将 Ni-Agarose 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（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 Ni-Agarose 介质加入层析柱）。 2. 用 5 倍柱体积（指填料的体积，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 (pH7.9)	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 uL 结合液), 再加入 25 uL 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 30 mg 溶菌酶干粉, 溶解后分装成 1 mL/管, 剩余的-20℃放置), 再加入 25 uL PMSF (10 mg/mL) 溶液和 1 uL Benzonase, 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 (pH7.9)	20 uL	20 mM
1 M 咪唑溶液	500 uL	500 mM
5 M NaCl 溶液	100 uL	500 mM
自备去离子水	380 uL	-

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
1M Tri-HCl (pH 7.9)	200 uL	200 uL
5M 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
1M Tri-HCl (pH7.9)	20 uL	20 uL
1M 咪唑溶液	500 uL	500 uL
5M NaCl 溶液	100 uL	100 uL
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。