



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

His 标签蛋白纯化试剂盒(耐还原螯合型)

产品编号	产品名称	包装
R32305-10ml	His 标签蛋白纯化试剂盒(耐还原螯合型)	10ml

产品简介:

源叶生产的 His 标签蛋白纯化试剂盒(耐还原螯合型) (His-tag Protein Purification Kit), 俗称镍柱试剂盒, 是一种采用了新型 His-tag Purification Resin (耐还原螯合型)的可以兼容还原剂和螯合剂, 并能简单、快速、高效并且高特异性地纯化 His 标签蛋白的试剂盒。

试剂盒提供了 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。

通常带有 6 个组氨酸标签的重组蛋白(6X His-tagged recombinant protein)或带有 6 个以上连续组氨酸标签的重组蛋白, 被称为 His 标签蛋白。蛋白样品溶液通过 His-tag Purification Resin (耐还原螯合型)时, 重组蛋白 His 标签上的组氨酸残基能特异性地结合到 His-tag Purification Resin (耐还原螯合型)中的镍离子上, 其它蛋白则不能被结合。洗涤后, His 标签重组蛋白可在非变性条件下被洗脱, 从而被分离纯化。

His-tag Purification Resin (耐还原螯合型)对 His 标签重组蛋白的亲合力强、选择性高、结合容量大, 可以获得高纯度的 His 标签重组蛋白, 可用于简单、快速、高效地纯化细菌、哺乳动物细胞、昆虫及杆状病毒等多种表达系统中表达的 His 标签重组蛋白。纯化的蛋白可以用于结构和功能研究、抗体制备、蛋白与蛋白相互作用、蛋白与核酸相互作用等方面的研究。

His-tag Purification Resin (耐还原螯合型)采用了一种高度交联的 6%琼脂糖凝胶(CL-6B, 与 Sepharose CL-6B 性能基本一致)为基质, 并使用了进一步优化的接臂和镍离子螯合技术, 和目前市售的大多数 Ni-NTA agarose 或类似产品相比, 非特异性蛋白结合显著降低, 耐受压力强, 镍离子螯合非常稳定。和同类产品相比, 本产品由于镍离子基本不会流失, 重复使用本纯化介质时不需要重新装载镍离子。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

Ni-NTA agarose 以及绝大多数类似的镍柱产品不能耐受蛋白样品中常见浓度的还原剂如二硫苏糖醇(DTT)、 β -巯基乙醇等以及常见浓度的螯合剂如 EDTA 等, 但 His-tag Purification Resin (耐还原螯合型)可以很好地耐受 DTT 等还原剂以及 EDTA 等螯合剂。本产品可耐受 20mM DTT 等还原剂, 以及 20mM EDTA 等螯合剂。这为需要添加还原剂或螯合剂的蛋白样品的纯化提供了可能性。本产品不兼容 8M 尿素和 6M 盐酸胍。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, 需要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。

His-tag Purification Resin (耐还原螯合型)已经螯合了镍离子, 呈蓝色, 凝胶的颗粒直径为 45-165 μ m。可耐受的最大压力为 0.025MPa, 约合 5.8psi。采用固定流速进行蛋白纯化时的推荐流速为 0.5ml/min。

His-tag Purification Resin (耐还原螯合型)可以高容量、高特异性地结合 His 标签蛋白。最大蛋白结合量为 20-30mg 蛋白/毫升凝胶。实际使用时的最大结合量取决于待纯化的 His 标签重组蛋白的分子量大小, 分子量越大则最大结合容量越大, 分子量越小则最大结合容量越小。对于分子量为 50kD 的蛋白, 每毫升凝胶的实际最大纯化量约为 6-10mg, 对于分子量为 100kD 的蛋白, 每毫升凝胶的实际最大纯化量约为 12-20mg。但对于分子量相同的蛋白, 也会因为蛋白本身特性的不同, 结合的最大容量也会有所不同。

His-tag Purification Resin (耐还原螯合型)储存在 30%乙醇中, 10ml 总体积中 5ml 为凝胶, 5ml 为液体, 需要充分重悬后再吸取。

一个包装的本产品足够进行 10 次 His 标签重组蛋白纯化, 每次细菌沉淀的湿重约为 1 克。每次蛋白的最大纯化量为 10-15mg, 具体的最大纯化量和蛋白分子量有关; 对于分子量为 50kD 的带有 His 标签重组蛋白, 每次的蛋白最大纯化量为 3-10mg。在不使用亲和层析柱空柱管的情况下, 参考本说明书本试剂盒足够进行 500 次的小量 His 标签蛋白纯化。

产品组成:

产品编号	产品名称	包装
R32305-10ml	His-tag Purification Resin (耐还原螯合型)	10ml
	非变性裂解液	120ml



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

	非变性洗涤液	60ml
	非变性洗脱液	60ml
	溶菌酶	60mg
	亲和层析柱空柱管(3 毫升)	10 套
—	说明书	1 份

保存条件:

2-8°C 保存, 一年有效。

注意事项:

请勿在-20°C 或更低温度冷冻保存 His-tag Purification Resin (耐还原螯合型)。

如果裂解液或镍柱平衡液中含有 DTT 等还原试剂, 建议预先使用 10-20 个柱体积的 非变性裂解液(配制方法附后)洗涤镍柱, 以充分去除可能残留的自由镍离子, 并使用含有 DTT 等还原剂的裂解液或平衡液平衡镍柱后再继续使用。

His-tag Purification Resin (耐还原螯合型)使用过程中, 缓冲试剂如 Tris、HEPES、MOPS 等的浓度不宜超过 100mM, EDTA 浓度不宜超过 20mM, SDS 和 sarkosyl 的浓度不宜超过 0.3%, Triton、Tween、NP-40 的浓度不宜超过 2%, 脱氧胆酸钠、CHAPS 的浓度不宜超过 1%, 组氨酸浓度不宜超过 20mM, 钙离子浓度不宜超过 5mM, 钠离子和镁离子浓度可以高达 2M, 甘油浓度可以高达 50%。其它未提及试剂的兼容性可以参考上述试剂, 但还有待实验验证。

His-tag Purification Resin (耐还原螯合型)保存和纯化过程中应始终保持凝胶湿润。

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。

蛋白样品收集后宜尽快完成纯化工作, 并应始终放置在 4°C 或冰浴, 以减缓蛋白降解。为有效抑制蛋白降解, 可以在裂解液中添加适量的蛋白酶抑制剂混合物。

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。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。

为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

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以直接参考“4. 简化的操作流程”。否则请参考如下详细内容：

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

1. 大肠杆菌中可溶性 His 标签重组蛋白的诱导表达：

如下以最常用的 IPTG 诱导表达系统给予说明，诱导表达条件的优化请参照所使用的诱导表达体系的详细说明。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。例如取 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 OD₆₀₀ 达到 0.5-0.7，并且 OD₆₀₀ 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、和诱导时间需要通过实验确定。

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，也可以在 -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：

本方法常用于小量样品的快速分析和鉴定，为后续大量制备打下基础。

a. 接步骤 1(e)，离心收集 1ml 菌液的细菌沉淀并弃上清，加入 100μl 非变性裂解液，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 200μl 裂解液；表达丰度非常低时，每毫升菌液沉淀可以加入 40μl 裂解液。本非变性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 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°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°C 离心(15000g × 10min)，取 10μl 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 20μl 混合均匀的 50% BeyoGold™ His-tag Purification Resin (耐还原整合型)，4°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。经测试，直接使用 50%His-tag

Purification Resin (耐还原螯合型)也能获得良好的纯化效果。但如果希望获得更高的标签蛋白得率,可以参考步骤 3f, 用一个柱体积的非变性裂解液平衡 His-tag Purification Resin (耐还原螯合型) 2-3 次。平衡后, 视不同的待纯化蛋白而定, 待纯化蛋白的得率有可能会提高约 5-20%左右。

f. 4°C 离心(1000g ×10s)沉淀凝胶, 取 20μl 上清留样作后续检测用, 其余上清弃去。

g. 加入 40μl 非变性洗涤液重悬凝胶, 4°C 离心(1000g ×10s), 取 20μl 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 20μl 非变性洗脱液, 轻轻重悬凝胶。4°C 离心(1000g ×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 60μl 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)非变性裂解液的比例加入裂解液, 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°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)如果超声处理后裂解液非常粘稠, 可以加入 RNase A 至 10μg/ml 及 DNase I 至 5μg/ml, 冰上放置 10-15min。或者也可以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°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 20μl 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。
上清中如果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 50% His-tag Purification Resin (耐还原螯合型), 4°C 离心(1000g × 10s)弃去储存液, 向凝胶中加入 0.5ml 非变性裂解液混匀以平衡凝胶, 4°C 离心(1000g × 10s)弃去液体, 再重复平衡 1-2 次, 弃去液体。将约 4ml 细菌裂解液上清加入其中, 4°C 在侧摆摇床或水平摇床上缓慢摇动 60min。

注: His-tag Purification Resin (耐还原螯合型)也可以不平衡直接使用, 但蛋白的得率有可能会下降 5-20%。

g. 将裂解液和 His-tag Purification Resin (耐还原螯合型)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 50% His-tag Purification Resin (耐还原螯合型)装柱, 然后用 0.5ml 非变性裂解液平衡 2-3 次后加入约 4ml 细菌裂解液上清, 后续可以把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一些, 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 非变性洗涤液, 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 法简单快速地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 非变性洗脱液洗脱。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。蛋白纯化效果可以参考图 1。

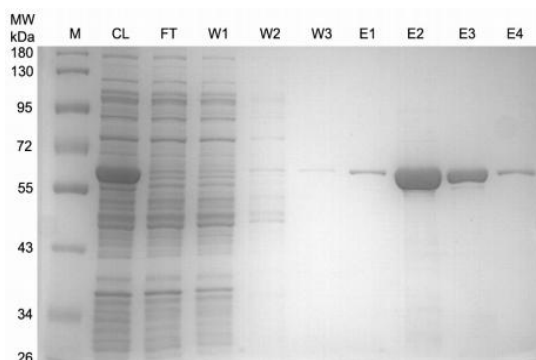


图 1. His 标签重组蛋白纯化效果图。M: marker; CL: 细菌裂解液(cell lysate); FT: 上样穿流液(flow through); W1-W3: 洗涤液 1-3 (wash 1-3); E1-E4: 洗脱液 1-4 (elution 1-4)。注: 实际的电泳结果会因样品、上样量等的不同而有所不同。

4. 简化的操作流程:

- 细菌中的目的蛋白诱导表达后, 离心沉淀细菌。
- 每克细菌沉淀湿重加入 4ml 非变性裂解液, 可添加适量蛋白酶抑制剂, 充分重悬细菌。
- 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℃ 保存。
- 冰上超声裂解细菌, 离心取上清。
- His-tag Purification Resin (耐还原螯合型)装柱, 1ml 非变性裂解液平衡纯化柱 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。
- 用 0.5ml 非变性洗涤液洗柱 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非变性裂解液作为洗涤液使用。
- 用 0.5ml 非变性洗脱液洗脱 6-10 次。
注: 通常该洗脱条件会比较理想。如果出现洗脱效果欠佳的情况, 可以自行提高咪唑浓度至 100-250mM。