

His-标签蛋白纯化（Ni-NTA 柱法）试剂盒（变性） 补充装

名称：His-标签蛋白纯化（Ni-NTA 柱法）试剂盒（变性）补充装

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

目录号：QYP1065

规格：10T, 20T, 50T

保存条件：室温（15-25℃）

保质期：1 年

包含试剂：

名称	英文名称	规格(10T)	规格(20T)	规格(50T)	保存条件
变性裂解液	Denature Lysis Buffer	100ml	200ml	500ml	室温
变性平衡液	Denature Balance Buffer	200ml	400ml	1L	室温
变性洗涤液	Denature Wash Buffer	100ml	200ml	500ml	室温
变性洗脱液	Denature Elution Buffer	100ml	200ml	500ml	室温

产品介绍

His-标签蛋白纯化（Ni-NTA 柱法）试剂盒（变性）用于实验室的 His 标签融合蛋白包涵体表达纯化。表达菌株经 IPTG 诱导表达蛋白、超声破碎、离心分离后的沉淀，使用 8M 尿素溶解，流经 His-标签蛋白纯化填料柱，样本中的 His 标签蛋白与蛋白纯化填料特异性结合，其他杂蛋白则不与柱子结合。样本经变性洗涤液洗涤除杂后，加入变性洗脱液，洗脱 His 标签蛋白。本试剂盒为 His-标签蛋白纯化（Ni-NTA 柱法）试剂盒（变性）（QYP063）补充装，含有变性蛋白纯化所需的裂解液、平衡液、洗涤液、洗脱液。本试剂盒不含 His-标签蛋白纯化填料及亲和层析柱。

实验例：

实验名称：包涵体表达 His-标签蛋白纯化

I. 大肠杆菌中 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°C 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°C 或 -80°C 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

1. 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。
2. 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。

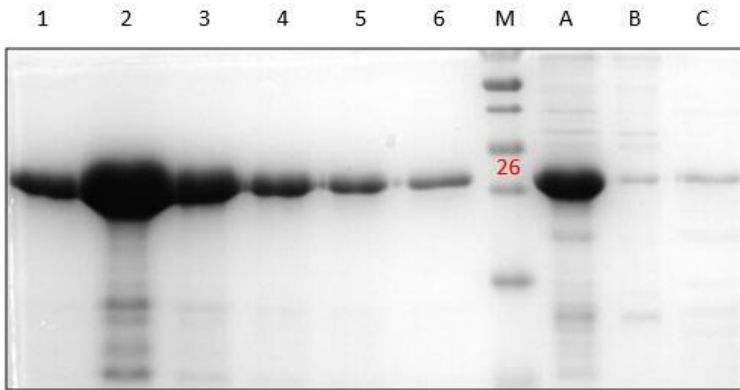
3. 超声破碎结束后，10000g，4°C 离心 20min。将上清与沉淀分开保存。
4. SDS-PAGE 电泳检测。确定蛋白是可溶性（上清）表达还是包涵体（沉淀）表达。

III. 包涵体表达 His 蛋白的变性纯化

1. 溶解：将超声破碎沉淀重悬于变性裂解液中（例：100ml 菌体收获的沉淀使用 10ml 变性裂解液重悬），在旋转摇床上室温溶解 30-60min。若样本体积大，可使用磁力搅拌器。搅拌 1h 后，大部分沉淀应溶解。
2. 离心：将溶解后的样本 10000g，室温离心 10min。收上清。
3. 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。
4. 平衡：向层析柱中加入 10 倍柱床体积的变性平衡液，清洗柱子。
5. 上柱：将溶解的沉淀加入层析柱。用离心管接住流穿液，反复上柱 3 次，使样本中的 His-重组蛋白与蛋白纯化填料充分结合。
6. 洗涤：向层析柱中加入 10 倍柱床体积的变性洗涤液，清洗柱子，除去非特异性结合的杂蛋白。
7. 洗脱：向层析柱中加入 10ml 变性洗脱液，洗脱目的蛋白。用 1.5ml 或 2ml 离心管接住流出液。
8. 再生：向层析柱中加入 10 倍柱床体积的变性平衡液，清洗柱子。
9. 保存：使用后的柱子应加入 10ml 含 20%乙醇的 PBS，盖上上下盖，直立保存在 4°C。

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 标签重组蛋白变性纯化

蛋白：His-GFP

1-6. GFP 洗脱 1-6 管

A. 包涵体溶解液

B. 沉淀溶解上柱流穿

C. 洗涤液