

His-标签蛋白纯化（Ni-NTA 柱法）试剂盒（非变性）补充装

名称：His-标签蛋白纯化（Ni-NTA 柱法）试剂盒（非变性）补充装

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

目录号：QYP1064

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
平衡液	Balance Buffer	200ml	400ml	1L	室温
洗涤液	Wash Buffer	100ml	200ml	500ml	室温
洗脱液	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（非变性）用于实验室的 His 标签融合蛋白纯化。表达菌株经 IPTG 诱导表达蛋白、超声破碎、离心分离后的上清，流经 Ni-NTA 琼脂糖凝胶柱，样本中的 His 标签蛋白与蛋白填料特异性结合，其他杂蛋白则不与柱子结合。样本经洗涤液洗涤除杂后，加入洗脱液，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（非变性）(QYP062)补充装，含有蛋白纯化所需的平衡液，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：可溶性 His-标签蛋白纯化

I. 大肠杆菌中可溶性 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℃ 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℃或-80℃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℃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. His 蛋白的非变性纯化

1. 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。

2. 平衡：用平衡液洗柱子 10 个柱床体积。

3. 加样：将上清上柱。接住流穿液，反复上柱 2-3 次，使 His 标签蛋白与蛋白纯化填料充分结合。

P.S. 上清必须保持澄清，不能含有任何不可溶杂质。否则会堵柱子，影响纯化获得蛋白的纯度。若杂质较多，可 10000g，4℃，10min 离心 1-2 次，经滤纸过滤，再经 0.45um 滤器过滤。

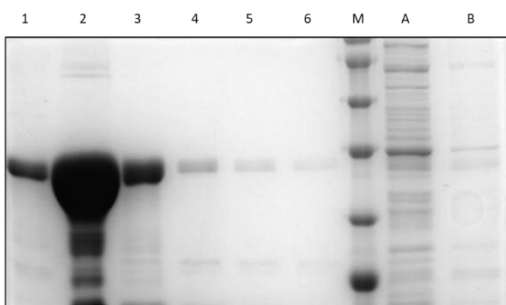
5. 洗涤：用洗涤液洗柱子 10 个柱床体积。

6. 洗脱：用洗脱液洗脱目的蛋白 5-10 个柱床体积。将样本收集到 1.5ml 或 2ml EP 管中。

7. 再生：用平衡液洗柱子 10 个柱床体积。

8. 保存：使用后的柱子应加入 20%乙醇-PBS，盖上上下盖，直立保存在 4℃。

9. 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 标签重组蛋白纯化（His-PAG）

1-6: 蛋白洗脱 1-6 管

A. 上清上柱流穿液

B. 洗涤液

M. Marker