

Biolinkedin® His 标签蛋白纯化试剂盒 (NTA-Ni 凝胶法)

包装清单

名称	货号	包装
His 标签蛋白纯化试剂盒 (NTA-Ni 凝胶法)	PK-2007	盒

产品概述

Biolinkedin® His 标签蛋白纯化试剂盒 (NTA-Ni 凝胶法) 是由 His 标签蛋白琼脂糖凝胶和优化预制的缓冲液以及 2 套层析柱空柱套装组成, 用于纯化各种表达系统融合表达的 His 标签重组蛋白。

试剂盒组成

His 标签蛋白琼脂糖凝胶 (NTA-Ni) (单品货号: L-2008)	10mL (50% v/v)
结合/平衡缓冲液 (2×)	100 mL
洗涤缓冲液 (5×)	100 mL
洗脱缓冲液	100 mL
蛋白快速染色液	50 mL
SDS-PAGE Sample Loading buffer (5×)	10 mL
亲和层析柱空柱套装	2 套

操作流程

实验前请使用超纯水将结合/平衡缓冲液 (2×) 和洗涤缓冲液 (5×) 稀释到 1×。

1. 样品准备

以大肠杆菌表达系统, 500mL 诱导菌液为例。

- 4°C 离心 30min (4000xg) 收集菌体, 弃上清。
- 用预冷结合/平衡缓冲液 (1×) 重悬菌体, 如果需要, 可加入适量的抑制剂, 如蛋白酶抑制剂 (PMSF) 或其他蛋白酶抑制剂等。

注意: 加入的抑制剂不能对 His 标签蛋白琼脂糖凝胶的性能有影响, 破碎液中不能含有 EDTA、EGTA 等螯合剂, DTT、巯基乙醇等还原剂, 尿素、盐酸胍等变性剂。

- 用超声波破碎法在冰上破碎菌体, 直到样品破碎完全。

可选: 如果裂解物太粘稠, 可以加入 RNase A (终浓度 10 µg/mL) 和 DNase I (终浓度 5µg/mL) 并在冰上孵育 10~15min。

- 4°C 离心 20min (12,000xg), 分离上清和沉淀, 并过滤除杂。将上清和沉淀留样以备后续检测。

2. 纯化重组 His 标签融合蛋白

- 轻轻重悬 His 标签蛋白琼脂糖凝胶 (NTA-Ni)。
- 吸取 2mL 的 His 标签蛋白琼脂糖凝胶 (NTA-Ni) 加至层析柱中, 用 10mL 结合/平衡缓冲液 (1×) 平衡 His 标签蛋白琼脂糖凝胶 (NTA-Ni)。重复上述步骤 1 次。
- 关闭层析柱下出口, 将制备好的含有 His 标签蛋白上清加入到层析柱中, 再盖紧层析柱上进口, 建议封口膜密封。置于混匀仪上, 室温孵育 1~2h。(也可置于 2~8°C 孵育 2~4h 或者过夜)
- 孵育结束后, 打开层析柱上下进出口, 待上清液全部流出层析柱后, 收集上清液, 作为流穿, 置于 2~8°C, 以备后续检测。

- 立刻加入 10mL 洗涤缓冲液 (1×) 至层析柱中, 收集洗杂液, 置于 2~8°C, 以备后续检测。重复上述步骤 4 次。

- 加入 1mL 洗脱缓冲液, 用 1.5mL 的 Ep 管收集洗脱液。分别收集 5~10 管。

- SDS-PAGE 检测

将得到的样品 (包括流穿、洗涤液和洗脱液) 以及原始样品使用 SDS-PAGE 检测纯化效果。加入适量蛋白快速染色液浸没 PAGE 胶, 然后置于摇床上摇动, 染色 10~30min 即可观测结果。

注: 目的蛋白保存前应透析或者超滤以去除咪唑等杂质, 再分装冻存到 -80°C。

(可选) 凝胶再生及储存

凝胶再生步骤请参考或直接购买我司 His 标签蛋白纯化再生试剂盒。

凝胶再生后, 可以立即使用, 如不立即使用, 需要将凝胶悬浮于等体积的 20%乙醇中, 置于 2~8°C 保存。

相关产品

货号	产品名称
PK-2001	His 标签蛋白纯化试剂盒 (凝胶法)
PK-2002	GST 标签蛋白纯化试剂盒 (凝胶法)
PK-2003	His 标签蛋白纯化试剂盒
PK-2004	GST 标签蛋白纯化试剂盒
PK-2005	His 标签蛋白纯化再生试剂盒
PK-2006	GST 标签蛋白纯化再生试剂盒
PK-2007	His 标签蛋白纯化试剂盒 (NTA-Ni 凝胶法)

问题解决

问题	原因	解决方案
洗脱液中 没有 目的蛋白	蛋白可能是包涵体, 上清无蛋白	可以通过电泳检测裂解液分析上清中是否含有目的蛋白, 包涵体蛋白需要按照包涵体蛋白的纯化方式。
	表达量太低	优化表达条件
	目的蛋白结合比较弱, 在洗杂步骤被洗下来了	降低咪唑浓度。
	目的蛋白被蛋白酶降解	在裂解步骤或洗涤步骤加入适量的蛋白酶抑制剂, 如 PMSF。
	目的蛋白不能有效地从凝胶上洗脱下来	增加其中咪唑浓度 使用10~100mM EDTA溶液剥离镍离子, 同时得到目的蛋白
纯化的目的蛋白不纯	洗杂不彻底	增加洗涤次数。
	样品中含有其他的组氨酸标签蛋白	通过调节咪唑浓度来优化洗杂条件。然后通过使用其他的纯化方式 (如离子交换, 疏水等) 进一步纯化洗脱组分。
结合过程中蛋白发生沉淀	浓度太大	适当稀释蛋白
	蛋白发生聚集	在样品和所有的缓冲液中添加稳定剂, 如 0.1%的 Triton X-100 或者 Tween-20。
	操作温度太高	2~8°C下操作。