

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

His 标签 (HHHHHH) 融合蛋白纯化试剂盒

His(HHHHHH)-tagged Protein Purification Kit

产品货号: EA-TP-K005

产品规格: 10 Tests

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: techsupport@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

背景信息

本试剂盒由 His 标签蛋白纯化填料、细胞裂解液、500mM 咪唑洗脱液和纯化柱组成，操作简单、性能优良，可快捷实现多种表达系统中带有 His 标签产物的纯化。

性能指标

1. 应用范围：

纯化各种表达系统中带有 His 标签的产物。

2. 基质属性：

高度交联的 6%琼脂糖微球。

3. 粒 径：

45-165 μm 。

4. 载 量：

>40mg 6 \times His-tagged protein/ mL 基质。

5. 最大压力：

0.3MPa, 3bar。

6. 主要成分：

3mL His 标签纯化填料，保存于 1mL 含 20%乙醇的 1 \times PBS 中。

产品组分

组分名称	组分编号	规格	保存方法
细胞裂解液 Lysis buffer	L1	50 mL	4°C, 12 个月
纯化柱 Purification column	C	1 个	室温, 12 个月
His 标签蛋白纯化填料 His tag Protein purification filler	G1	20mL	4°C, 24 个月
500mM 咪唑洗脱液 500mM Imidazole elution buffer	E3	50 mL*2	4°C, 6 个月
PBS Buffer, pH7.4 (10×)	P10	30 mL	4°C, 12 个月
说明书一份			

注意事项

1. 运输和保存:

本试剂盒在冷藏条件下运输。

收货后请将纯化柱 C 取出, 室温保存; 试剂盒及其它成分保存于 4°C。

试剂配制

1. 1× PBS

按照 9:1 的比例用去离子水将 P10(PBS Buffer, pH7.4 (10×))稀释待用, 例如: 1mL P10 加入 9mL 去离子水, 混匀后即为 1×PBS。现用现配。

2. 洗杂液

按照 9:1 的比例用去离子水将 E3(500mM 咪唑洗脱液)稀释待用, 例如: 1mL E3 加入 9mL 去离子水, 混匀后即为 50mM 咪唑洗脱液。现用现配。

使用方法

1. 样本处理

a. 原核表达样本制备

- 1) 接种 60 μ L 菌种至 200mL 抗性培养基中，37 $^{\circ}$ C 培养过夜。
- 2) 次日加入新鲜抗性培养基至 800mL，继续培养 1-2h 细菌活力最旺盛。
- 3) 加入 200 μ L 的 1M IPTG 37 $^{\circ}$ C 诱导 3.5h。
- 4) 4000rpm，4 $^{\circ}$ C，离心收集菌体，弃上清，加入 30mL 1 \times PBS 重悬菌体，冰浴条件下超声 200W 破碎 6min。

注：为了避免目标蛋白质降解，您可以加入蛋白酶抑制剂（PMSF 工作浓度 0.1~1mmol/L）

- 5) 超声结束后，8000rpm，4 $^{\circ}$ C 离心 15min。取上清，即可进行下一步纯化操作。
- 6) 若目标蛋白是分泌表达的，不需要上述处理，直接收集培养基上清，浓缩后即可进行以下步骤。如果目标蛋白质含量较高，建议用 1 \times PBS 稀释样品至目标蛋白质终浓度为 10~100 μ g/mL。

b. 细胞裂解液制备

- 1) 收集细胞
悬浮细胞和半贴壁细胞从细胞培养瓶上吹下来后转入离心管中，1000rpm 离心 5min，弃上清。
贴壁细胞用细胞刮子轻轻从瓶壁上刮下来，连同培养基转入离心管中，1000rpm 离心 5min，弃上清。
- 2) 用预冷至 4 $^{\circ}$ C 的 1 \times PBS 重悬细胞，1000rpm 离心 3min，弃上清。重复一次。
- 3) 根据细胞的量加入相应体积的细胞裂解液 L1，反复吹打后冰上放置 10-20min。

注：一般 1mL 细胞裂解液可以处理约 0.5~1 \times 10⁷ 个细胞。为了避免目标蛋白质降解，您可以加蛋白酶抑制剂（PMSF 工作浓度 0.1~1mmol/L）。

- 4) 用超声破碎仪处理细胞裂解液，直至细胞裂解液透明，不再粘稠。冰上放置 30min 之后，12000rpm，4°C 离心 10min。取上清即为蛋白样本。建议立即进行下一步实验，若时间不允许，置于 -80°C 保存。

注：若无超声破碎仪，也可使用削成斜口的枪头或注射器反复吹吸，直至细胞裂解液透明，不再粘稠。

- 5) 若目标蛋白是分泌表达的，不需要上述处理，直接收集培养基上清，浓缩后即可进行以下步骤。如果目标蛋白质含量较高，建议用 1×PBS 稀释样品至目标蛋白质终浓度为 10~100μg/mL。

2. 装柱及孵育

- 1) 温和混匀填料，用切去末端的枪头吸取 2mL 悬液至纯化柱中，以 3~5 倍柱体积去离子水冲洗残留的 20%乙醇。
- 2) 待液体流尽后，向凝胶柱中加入 10 倍凝胶体积的 1×PBS，清洗填料。
- 3) 待液体流尽后，加入含有目标蛋白的细胞裂解液。用管帽和堵头密封纯化柱，密封过程中，请先将管帽插入纯化柱上端，然后翻转纯化柱，使得排液口朝上，轻轻敲击管壁，让柱中气泡上浮，推动管帽，使气体排出纯化柱，最后用堵头密封排液口。
- 4) 4°C 在摇床上缓慢摇动孵育 30min，以充分结合带 His 标签的目的蛋白，也可根据时间安排或实验需要孵育更长时间甚至过夜。

注：若裂解液体积较大，可将填料与裂解液混合于 50mL 离心管中孵育，孵育结束后再转移至纯化柱。

- 5) 收集流穿的细胞裂解液，暂时保存于 4°C，用于可能的再次纯化。

注：可收集流穿液重复上柱 3~5 次以充分结合目的蛋白。

3. 除杂与洗脱

- 1) 待细胞裂解液流尽后，加入 5 倍凝胶体积的洗杂液，清洗结合了目标蛋白的填料。此步骤重复 3 次。

- 2) 收集每次的洗杂液，SDS-PAGE 检测洗杂液中的蛋白残留，待 G250 检测无明显颜色变化后停止洗杂，准备进行下一步洗脱步骤。
注：如果后续出现蛋白纯度不够高的情况，可以再增加洗柱次数 2~3 次。洗柱过程中收集每次流穿液 20 μ L 以备后续检测使用。
- 3) 使用洗脱液 500mM 咪唑洗脱液洗脱 3~5 次，每次 0.5 倍柱体积，4 $^{\circ}$ C 静置孵育 10min，收集洗脱产物，4 $^{\circ}$ C 暂存，待 SDS-PAGE 检测，可立刻使用或置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

声明

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究使用。
2. 请注意安全事项，遵守实验室试剂操作规范操作。
3. 本试剂盒提供的裂解液是经过长时间反复优化的配方，经过大量实验验证。处理细胞时，建议使用本试剂盒配套的裂解液，其他厂家提供的裂解液可能影响蛋白纯化或者后续实验结果。
4. 本说明书中推荐的条件是通用的，用户可根据不同目标蛋白的性质，优化实验条件，选择最合适的实验方案。