

His-Tag 蛋白纯化试剂盒(磁珠法)

产品描述

Biolinkedin® His-Tag 蛋白纯化试剂盒是由 His 蛋白纯化琼脂糖磁珠，经过优化预制的缓冲液以及 50mL 的磁力架组成，用于纯化各种表达系统融合表达的 His 重组蛋白。

产品组成

His 蛋白纯化琼脂糖磁珠	10mL (20% V/V)
结合/平衡缓冲液	100 mL
洗涤液	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
磁力架	50mL 双排四孔

纯化步骤

1. 样品准备

以大肠杆菌表达系统为例

- 1). 4℃离心 30 min (4000 g) 收集菌体，弃上清。
- 2). 用冷**结合/平衡缓冲液**重悬细胞，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 蛋白纯化琼脂糖磁珠** 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。

- 3). 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 5 µg/mL) 并在冰上孵育 10-15 min。

- 4) 4℃离心 20 min (12,000 g)，除菌过滤，并小心将上清和沉淀分离。

- 5). 用 SDS-PAGE 分析 His 融合蛋白的含量及可溶性。

2. 纯化重组 His 融合蛋白

- 1). 将 **His 蛋白纯化琼脂糖磁珠** 充分混匀，使用移液器取适量的磁珠悬浮液，置于离心管中，磁性分离，弃上清。

- 2). 加入与上述磁珠悬浮液等体积的**结合/平衡缓冲液**，使用移液器反复吹打 5-10 次，磁性分离，弃上清，重复洗涤 2 次。

- 3). 将制备好的含有 His 融合蛋白澄清菌液加入到处理好的磁珠中，颠倒混匀。将离心管置于混匀仪上，室温孵育 30min。(也可置于 2-8℃孵育 1h 或者过夜)

- 4). 结合结束后，将离心管置于磁力架上，磁性分离，弃上清（保留，以备检测）。向离心管中加入 2-5 倍悬浮液体积的**洗涤液**，移液器反复吹打 5-10 次，然后磁性分离，用移液器吸取上清（保留，以备取样检测）。重复上述步骤 3 次。

- 5). 洗脱蛋白时可根据需要调整洗脱体积从而调整蛋白浓度的目的。建议用 2-5 倍柱体积的**洗脱缓冲液**加入到离心管中，移液器轻轻吹打 3-5 次，混匀，磁性分离，然后用移液器吸取上清液，即为目的蛋白。如有需要，可以重复上述步骤 1 次，以提高蛋白回收量。

- 6). SDS-PAGE 检测纯化效果，将 PAGE 胶取下放入塑料器皿中，加入适量蛋白快速染色液覆盖 PAGE 胶，然后至于摇床上摇动，染色时间 0.5h-2h 或过夜均可。

- 7) 染色结束后，PAGE 胶放置于水中保存并拍照。

4. 磁珠再生

将装有磁珠的离心管中加入 1mL **洗脱缓冲液**，用移液器反复吹打 3-5 次，使磁珠重复悬浮，然后置于磁力架，磁性分离，弃上清，重复该操作 2 次。向离心管中加入 1mL 去离子水，用移液器反复吹打 3-5 次，使磁珠重复悬浮，然后置于磁力架，磁性分离，弃上清，重复该操作 2 次。最后加入 20%乙醇中，使总体积等于初始悬浮液体积，置于 2-8℃ 保存。

5. 可能遇到的问题及解决办法

问题	原因	解决方案
洗脱组分中没有目的蛋白	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	提高 wash Buffer 的 pH，或者降低咪唑浓度。
	融合蛋白被蛋白酶降解	在裂解步骤或洗涤步骤加入适量的蛋白酶抑制剂，如 PMSF。
	融合蛋白不能有效地从磁珠上洗脱下来	降低 Elution Buffer 的 pH 值，或者增加 Elution Buffer 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
回收的重组蛋白不纯	洗杂不彻底	增加 Wash Buffer 体积。
	样品中含有其他的组氨酸标签蛋白	通过调节 pH 值，或者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。
	操作温度太低	室温下进行上样。