

Biolinkedin® His 标签蛋白纯化试剂盒 (包涵体蛋白)

包装清单

名称	货号	包装
His 标签蛋白纯化试剂盒 (包涵体蛋白)	BK-2008	盒

产品概述

Biolinkedin® His 标签蛋白纯化试剂盒 (包涵体蛋白) 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 His 标签的包涵体蛋白, 洗脱样品可直接用于 SDS-PAGE 电泳检测, 最终样品需要通过复性后用于特定用途。

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)
变性裂解/结合液	120 mL
变性洗涤液	120 mL
变性洗脱液	120 mL
蛋白快速染色液	50 mL
PMSF (100×)	1mL
SDS-PAGE Sample Loading buffer (5×)	10 mL
亲和层析柱空柱套装	2 套

操作流程

本试剂盒只适用包涵体蛋白纯化, 实验前请确认蛋白的可溶性。

1. 样品准备

以大肠杆菌表达系统, 1000mL 诱导菌液为例。

- 4°C离心 30min (4000xg) 收集菌体, 弃上清。
- 用预冷 1×PBS 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 (NTA-Ni) 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。

- 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 10µg/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, 收集沉淀, 沉淀即为包涵体。

- 用预冷 1×PBS 重悬包涵体, 洗涤包涵体, 4°C离心 20min (12,000xg), 重复一次。

- 称取 0.5~0.8g 包涵体重悬于 8mL 变性裂解/结合液中, 置于旋转混匀仪上, 溶解 1~2h 充分使包涵体溶解(或 2~8 度, 过夜溶解)。

- 4°C离心 20min (12,000 x g), 收集上清。建议离心后上清用 0.22µm 或 0.45µm 滤膜过滤。上清待用。

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 2mL 变性裂解/结合液平衡 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 标签包涵体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 5mL 变性洗涤液至层析柱中, 收集洗杂液, 置于 2~8°C, 以备后续检测。重复上述步骤 2 次。

- 加入 1mL 变性洗脱液, 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:

1. 纯化后包涵体蛋白可进行下一步蛋白复性操作。
2. 蛋白复性方法一般包括稀释复性、透析复性、超滤复性、柱上复性等方法进行选择。
3. 包涵体复性效率的影响因素: 蛋白质本身性质、温度、蛋白浓度、复性缓冲液的 pH, 变性剂的起始浓度和去除速度、氧化还原电势、离子强度、共溶剂和其他添加剂的存在与否等因素。需综合考虑保证包涵体复性成功。

(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, 需要将凝胶清洗后, 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)
BK-2008	His 标签蛋白纯化试剂盒 (包涵体蛋白)

问题解决

问题	原因	解决方案
洗脱液中 没有 目的蛋白	蛋白可能是可溶表达, 无包涵体蛋白	可以通过电泳检测裂解液分析是否含有包涵体蛋白, 可溶蛋白需要按照可溶蛋白的方式进行纯化。
	测序检查基因序列	基因序列存在问题
	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	可自行配制洗涤液, 降低咪唑浓度或提高 pH。
	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。然后复性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。
	操作温度低	可室温下操作。