

HIS 标签融合蛋白纯化试剂盒

His Microspin Purification kit

将目标蛋白与 6xhis 融合表达, 然后利用固定化的镍进行纯化, 是比较经典的纯化路线。简单, 快捷, 纯度高。本试剂盒将亲和层析技术与离心柱技术相结合, 提供了一种快速简便的融合蛋白纯化途径。

固定化 Ni 填料: Ni-Sepharose FF (Ameshame Pharmacia) 结合容量: 大于 10 mg /ml。

离心柱: 小离心柱上样体积 0.7 ml, 配套 2 ml 离心管。

样品处理量: 每个样品纯化蛋白 500µg-1mg; 也可以根据样品量自由调节。

操作时间: 小量纯化小于 30 分钟。

试剂盒组成

Mini spincolumn	10 支
Ni-Sepharose FF	1.5 ML
1 X PBS	10 ML
PNI ₂₀ (20mM Imidazole)	15 ML
PNI ₄₀₀ (400mM Imidazole)	3 ML

一、细胞的培养

- 1、挑取单菌落到 8 ml 2 X YTA 培养基, 37°C 震荡培养大约 5 小时至 A₆₀₀ 0.6-0.8。
- 2、根据载体使用说明, 加入相应浓度诱导剂。一般 IPTG 的终浓度为 0.1-1mM。
- 3、诱导培养 2 小时。
- 4、离心收集菌体。去掉液体。
- 5、将菌体重悬于冰温的 1 X PBS。每 ml 培养物使用 50 微升 1 X PBS, 8 ml 培养物使用 400 微升 1 X PBS。

二、细胞的裂解

- 1、加入溶菌酶溶液 (10mg/ml) 至终浓度 100 微克/ml (于 400 微升菌体悬液中加入 4 微升溶菌酶溶液)。并加入 DNase I 至终浓度 10 微克/ml。室温作用 10 分钟。

- 2、将样品于干冰或 -80°C 冰箱中冷冻 30 秒, 马上防入 50°C 温水浴中融化。这样重复冻融 5-10 次可完全裂解细胞。
- 3、14000rpm 离心 10 分钟, 沉淀不溶物。将上清液用于后续纯化。

三、纯化

- 1、将 Ni-Sepharose FF 震荡混匀, 取 150 微升放入小离心柱, 500g 离心 1 分钟。加入 600 微升 PNI₂₀ 溶液, 再次 500g 离心 1 分钟。此步目的是更换介质缓冲液。
- 2、将细胞裂解液移入离心柱内, 加盖, 翻转几次, 将吸附介质与样品混匀。重复翻转 5 分钟, 以使介质与样品充分结合。500g 离心 1 分钟。
- 3、加入 600 微升 PNI₂₀ 溶液以漂洗介质, 500g 离心 1 分钟。
- 4、加入 100-200 微升 PNI₄₀₀ 溶液以洗脱样品, 室温作用 10 分钟。500g 离心 1 分钟, 收集洗脱液储存或分析。

注:

- 1、在离心柱的离心步骤中, 以能实现固液分离, Ni-Sepharose FF 介质不过于干燥为宜。可根据情况适当调整离心速度和时间。
- 2、重复一次 PNI₂₀ 溶液漂洗, 可以增加产物的纯度, 同时也会降低产物的回收率。
- 3、如果得率很低, 可能是产物形成了包含体, 应采取相应处理步骤 (见精编分子生物学实验指南-变性条件下纯化带组氨酸尾的不溶性融合蛋白)。

