



摇摇乐™ 大肠杆菌蛋白表达与纯化试剂盒

目录

1. 产品介绍	1
2. 使用方法	3
3. 注意事项	5
4. 参考信息	6
5. 订购信息	6
6. 相关产品	7

1. 产品介绍

1.1 试剂盒介绍

大肠杆菌重组蛋白表达体系具有操作简单、成本低廉、周期短的优势，是生命科学实验室中最常用的重组蛋白表达体系。但这一体系并不完美，主要的问题在于：①外源蛋白在大肠杆菌体系中重组表达时，有很大概率形成包涵体；②某些重组蛋白表达量不高，难以纯化；③部分重组蛋白表达过程中降解，一步亲和层析，难以去除降解带；④大肠杆菌诱导表达后，要进行裂菌操作，超声破碎裂菌受到设备的通量限制，不利于多样本并行纯化制备。

摇摇乐™ 试剂盒 (Shakit™) 正是针对上述痛点而设计，通过整合四种核心组分——促进大肠杆菌胞内可溶表达的质粒载体、方便快速通量化裂菌的裂菌液、基于纳米抗体的高亲和力磁珠、高效解离目标蛋白的洗脱液——协同提升蛋白制备的成功率，同时缩短纯化周期并扩展操作通量。整个流程在菌体收集后，仅需裂菌液裂解、磁珠捕获目标蛋白、洗杂与洗脱等步骤，全程通过震荡孵育即可完成，无需超声或复杂设备，故名“摇摇乐™”。本说明书附有详细操作步骤，建议用户在实验前完整阅读，以确保获得最佳使用效果。

1.2 组分介绍

试剂盒包含四种必要组分，实验所需的其他常规通用缓冲液，需用户自备。本产品提供两种规格：10 T 和 50 T，每一个 Test 可纯化 1 mg 左右的目的蛋白，组分信息见表 1。需要更大包装，请联系当地销售代表。

表 1: 摇摇乐组分介绍

试剂盒组分	规格/10 T	规格/50 T	储存温度
pShakit	10 µg	50 µg	-20 °C
Anti-HA Magrose Beads	1 ml	5 ml	2-8 °C
铁锤超级解菌液	2 ml	10 ml	-20 °C
Ulpase	60 µl	300 µl	-20 °C

1.3 pShakit 载体

1.3.1 pShakit 载体介绍

pShakit 为大肠杆菌重组蛋白表达专用载体，以 pET28a 为基础骨架，在其读码框中接入了 Flag-HA-Sumo 多标签序列。HA 标签可被 Anti-HA Magrose Beads 高效特异性捕获；Flag 标签适用于免疫印迹等检测分析；Sumo 标签可显著提升目的蛋白可溶性表达水平，且可经 Sumo 蛋白酶 (Ulpase) 特异性酶切去除，释放目的蛋白，实现高效纯化。pShakit 载体内置 EGFP 荧光蛋白表达序列，可作为阳性对照质粒，用于验证重组蛋白表达与纯化全流程体系的有效性。通过观测菌体裂解液、流穿液及洗脱液的荧光信号，可直观监测各步骤中目的蛋白的分布与流向，便于实验过程质控。质粒基础信息见表 2。

表 2: pShakit-Sumo-His 载体信息

载体名称	pShakit
抗性	卡那霉素抗性 (Kanamycin R+)
酶切位点	BamH I、Xho I、HindIII
插入序列	EGFP 基因序列
测序引物	正向引物，pShakit-Fseq: GATGGAAGCGTTTGCAAAGC；反向引物，T7-Ter: GCTAGTTATTGCTCAGCGG

1.3.2 pShakit 载体图谱

图 1 为 pShakit 载体图谱，全序列请见 pShakit 载体产品说明书（货号：BR0152）。

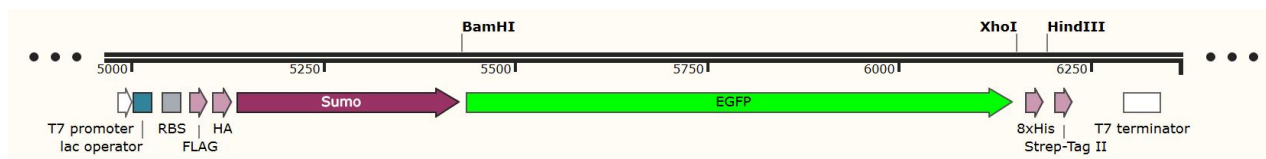


图 1. pShaKit 载体图谱示意图

1.3.3 pShaKit 多克隆酶切位点

pShaKit 载体的 EGFP 基因上游为 BamH I 酶切位点, 下游为 Xho I、HindIII 酶切位点, 可通过酶切连接、同源重组等常规分子克隆方法插入目的基因。上游使用 BamH I 位置接入, 需确保目的基因位于正确的读码框内。重组蛋白表达时, 目的蛋白上游将带有 Flag-HA-Sumo 的标签 (表观分子量增加 24 kDa), 方便检测与纯化。这一标签将在后续纯化过程中, 被 Ulpase 蛋白酶切除。载体 Xho I 酶切位点下游携带 His8-tag, 选择此位点可以让目的蛋白带有 C 端的 His8-tag, 方便镍柱亲和纯化。载体 HindIII 酶切位点下游带有 Strep-tag, 选择此位点可以让目的蛋白带上 Strep-tag, 方便 STarm 填料亲和纯化。通常我们推荐, 保留 C 端的 His8-tag 或 Strep-tag, 用于后续二次亲和纯化, 可有效提升蛋白纯度, 去除降解带。如果不希望目的蛋白携带 C 端标签, 可以在目的基因下游接入终止密码子, 避免 C 端标签的表达。蛋白酶去除 N 端标签后, 可获得无标签重组蛋白, 蛋白结构更接近天然状态。完整读码框的核苷酸与氨基酸序列见表 3。

表 3: pShaKit 载体多克隆位点序列

载体名称	pShaKit
核苷酸序列	ATGGGAGATTATAAAGATGATGACGACAAGGGTGGTTATCCGTACGATGTTCCGATTATGCGGGTGGTTCTGACAGCGAAG TCAACCAGGAGGCGAAGCCGGAGGTGAAGCCGGAGGTAAAACCAGAGACACATATTAACCTGAAAGTTAGCGATGGCTCTT CCGAGATCTTCTTCAAAATCAAGAAAACACGCCGTTGAGACGTCTGATGGAAGCGTTTGCAAAGCGCCAGGGTAAGGAGA TGGATTCCCTGCGTTTTCTGTACGACGCGATCCGCATTAGGCTGACCAAAACCCGGAGGACCTGGACATGGAGGACAACG ATATTATCGAGGCGCATCGTGAACAAATTGGTGGTGGATCCGTCTAAGGGTGAAGAAGCTTTTACCGCGCTTGTCCGATC CTGGTCTGAATTAGATGGCGACGTTAACGGTCACAAATTCAGCGTGTCCGGCGAGGGTGAGGGCGATGCAACCTACGGCAAA CTGACCCCTCAAGTTCATTTGTACCACTGGTAACTGCCAGTTCCTGGCCTACGCTCGTGACCACCTTACGCTACGGGGTG CAGTGCTTTAGCCGTTATCCGGACCACATGAACAACATGACTTCTTCAAAGCGCTATGCCGGAGGGTTACGTGCAAGAAC GTACGATTTTTTCAAGGACGACGGCAATTACAAGACGCGTGCCGAAGTCAAGTTCGAAGGTGATACCCTGGTTAACCGCAT CGAGTTGAAGGGCATTGATTTCAAGGAGGACGGCAACATCTTGGGTACAAATTGGAATATAACTATAATAGCCACAACGTGT ATATCATGGCTGACAAACAAAAACGGCATTAAAGTGAACTTAAGATCCGTCATAATATTGAAGACGGCAGCGTTTCAGCTG GCGGACCACTACCAGCAGAATACCCGATCGGCGATGGTCCGGTCTGCTGCCGGATAATCATTATCTGTGACCCAAAGC GCCCTGAGCAAAGATCCGAATGAAAACGCGATCACATGGTATTGCTGGAATTTGTAACCGCGGCAGGTATCACCTGGGTGTA TGGATGAAGTGTACAAGTAACTCGAGGGTGGTCAACCACCACCACCACCACCACCTAAAGCTTGGTGGTGGAGCCACC CGCAGTTCGAAAAATAA
氨基酸序列	MGDYKDDDDKGGYPYDVPDYAGGSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAFARQKGEMDS LRFYLDGIRIQADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQIGGGSVSKGEELFTGVVPIVLVDGVDVNGHKFSVSGEGEGDATYGLTLKFIC TTGKLPVPWPTLVTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFKFSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKED GNILGHKLEYNYSNHNVIYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHM VLEFVTAAGITLGMDELYKLEGGHHHHHHHH*KLGGWSHPQFEK*
备注	紫色标记的是标签序列: DYKDDDDK 为 Flag 标签, YPYDVPDYA 为 HA 标签, HHHHHHHH 为 8× His 标签, WSHHPQFEK 为 Strep 标签; 灰色标记的为 Sumo 序列; 红色箭头标示 Ulpase 蛋白酶酶切位置; 绿色标记的为 EGFP 蛋白序列。黄色标记为构建所需酶切位点: GGATCC 为 BamH I 位点, 编码 GS 氨基酸残基; TCGAG 为 Xho I 位点, 编码 LE 氨基酸残基; AAGCTT 为 HindIII 位点, 编码 KL 氨基酸残基。* 代表终止密码子。

1.4 Anti-HA Magrose Beads

Anti-HA Magrose Beads 是表面偶联了抗 HA-tag 纳米抗体 (VHH) 的琼脂糖磁珠。该纳米抗体为本公司专门针对重组蛋白纯化而开发的重组羊驼抗体, 它对 HA-tag 具有优异的结合能力, 可特异性捕获带有 HA 标签的融合蛋白。磁珠表面偶联的纳米抗体密度高, 因此具有杰出的结合载量, 其主要性能参数详见表 4。

表 4: Anti-HA Magrose Beads 产品性能

项目	性能
微球基质	磁性交联琼脂糖微球
配体	Anti-HA 标签纳米抗体
粒径	30-100 μm
标签蛋白结合载量	≥ 8 mg/ml 磁珠体积 (检测蛋白为 EGFP, 分子量约为 26 kDa)

项目	性能
磁珠浓度	磁珠占总体积的 20 %，即 1 ml 磁珠固体，总体积为 5 ml
储存缓冲液	20 mM Tris (pH=8.0) , 0.01 % Tween 20, 0.05 % Proclin 300

1.5 铁锤超级裂菌液

铁锤超级裂菌液为本公司独立研发的高性能大肠杆菌裂解试剂，它可以同时处理多组样本，替代繁琐的超声破碎过程，可实现菌体快速、温和、低成本裂解，高效释放胞内目的蛋白。该产品含溶菌酶和核酸酶组份，可于 10 min 内破坏大肠杆菌胞壁结构，消化菌体 DNA 与 RNA，降低样品粘度，释放胞内目的蛋白，方便后续纯化。

1.6 Ulpase

Ulpase 是一种重组的蛋白酶突变体，该蛋白酶可特异性识别 Sumo 酶切位点，在 Sumo 标签与目的蛋白之间精准切割，释放目的蛋白片段。此外，Sumo 蛋白酶为构象依赖性蛋白酶，酶切完成后可特异性结合于 Sumo 标签上，不会残留在洗脱液中。**但是请注意 Sumo 标签下游紧邻的第一个氨基酸残基会显著影响 Sumo 蛋白酶的酶切效率，建议在质粒构建时保留 GS 酶切位点，以提升酶切效率；同时应避免目的蛋白首位氨基酸为脯氨酸 (Pro/P)，该情况易导致酶切不完全或无法酶切。**

2. 使用方法

2.1 摇摇乐使用流程图

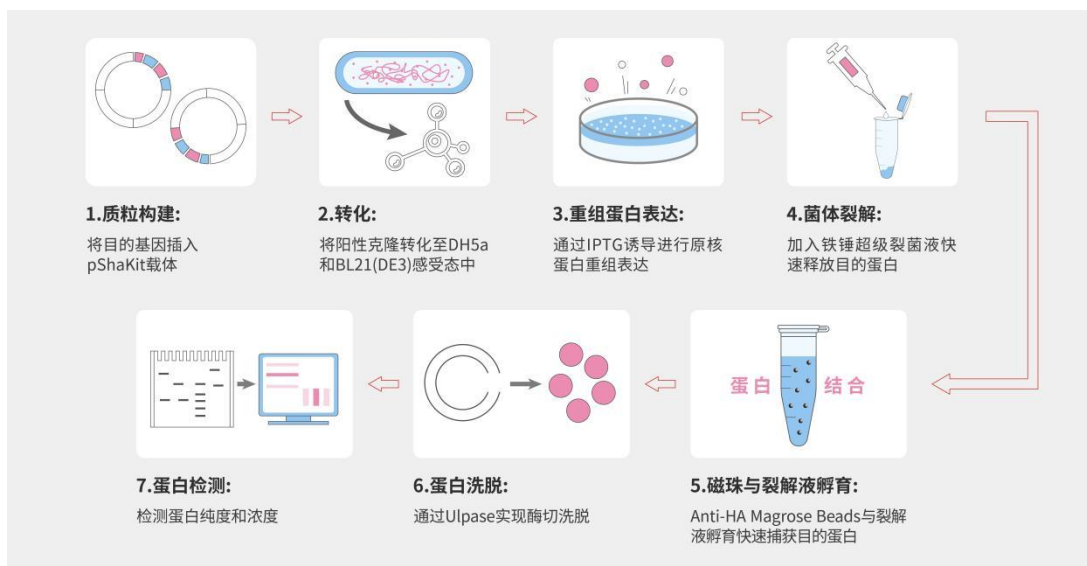


图 2. 摇摇乐™ 大肠杆菌蛋白表达和纯化试剂盒使用流程简图

2.2 质粒构建

目的基因的核苷酸序列可通过 NCBI、Uniprot 等公共数据库查询获取。获取序列后，可利用 Primer 5.0、Oligo 等引物设计软件设计特异性引物，也可通过全基因合成的方式获得目的片段，再通过相应分子生物学方法将目的片段插入 **pShaKit 载体**。pShaKit 载体含 BamH I、Xho I 及 HindIII 酶切位点（内切酶位点选择方案详见 1.3.3 章节）。目前常用的质粒构建方案主要有两种，具体操作如下：

1) 酶切连接法：需在正向引物的 5' 端及反向引物的 3' 端分别引入对应酶切位点及保护碱基，通过 PCR 扩增获得目的片段。扩增完成后，将目的片段与 pShaKit 载体进行同步酶切处理，酶切产物经回收纯化后采用 T4 DNA 连接酶连接，制备环状重组质粒。PCR 扩增、酶切及连接反应的具体体系与操作步骤可参考所购买酶试剂的产品说明书。

2) 同源重组法：该方法操作更为简便，仅需对 pShaKit 载体进行酶切处理，无需对 PCR 扩增获得的目的片段进行酶切。引物设计时需在正向引物的 5' 端及反向引物的 3' 端分别引入不少于 20 个碱基的载体同源臂，随后使用无缝克隆试剂盒（可参考 DNA Assembly Cloning Kit：常州伯仪生物，货号 BK0024-01）将目的片段插入载体，完成重组质粒构建，具体步骤可参考说明书进行。

备注：本公司提供 BamH I /Xho I 和 BamH I /HindIII 双酶切后的载体（货号分别为 BR0155 和 BR0156），如有需求可联系当地销售代表。

2.3 转化

目的基因接入 pShaKit 质粒的读码框之后，建议先将重组质粒转化至 DH5α 克隆菌株的感受态细胞中，选取 3 个阳性克隆进行测序（测序引物参考表 3 或者 pShaKit 质粒说明书信息）；测序正确后，提取该克隆对应的质粒，再将其转化至 BL21 (DE3) 表达菌株的感受态细胞中，用于诱导表达。具体转化步骤如下：

1) 混合冰浴：取 2 μl 连接产物加入至 50 μl 感受态细胞悬液中，轻轻混匀后在冰上放置 30 min，促进 DNA 吸附到细胞表面；



- 2) 热激处理: 将混合液放入 42 °C 水浴中热激 90 s, 然后立即放回冰上冷却 5 min, 温度差促使 DNA 进入细胞内部;
- 3) 恢复培养: 加入不含抗生素的 LB 培养基, 37 °C 摇床振荡培养 1 h, 使细菌恢复正常生长状态并表达抗生素抗性基因;
- 4) 筛选转化子: 将菌液涂布于含合适抗生素的固体平板上, 37 °C 倒置培养 16-24 h, 长出的菌落即为抗性阳性克隆。

2.4 重组蛋白表达

重组质粒成功转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞后, 保存甘油菌备用。

取表达菌株划线涂盘的培养皿, 挑取形状圆亮的单克隆, 接种至 4 ml 含有卡那霉素的 LB 培养基中, 进行过夜培养, 获得种子菌液。

- 1) 第二天, 按 1:200 比例进行菌种接种, 即取 2 ml 菌种接种至 400 ml LB 液体培养基中(需添加 Kanamycin 抗生素), 37 °C、220 rpm 条件下振荡培养 3 h;
- 2) 培养 3 h 后, 每 30 min 取样检测菌体 OD600 值, 待 OD600 值达到 0.6 左右, 加入终浓度 0.1 mM IPTG 进行诱导表达, 诱导表达合适时间后收菌 (37 °C 诱导 4-6 h 或 18 °C 低温诱导过夜)。

备注: 首次进行目的蛋白表达时, 建议摸索最优表达温度: 分别为 37 °C 诱导 4 h、22 °C 诱导 6 h 和 18 °C 诱导 12-16 h。诱导结束后离心收菌, 铁锤超级裂菌液裂菌, 电泳检测离心前的裂解液与离心后的上清, 可判断蛋白是否可溶。不推荐做 IPTG 浓度摸索, 下调 IPTG 浓度促进可溶表达能力有限。

2.5 菌体裂解

使用铁锤超级裂菌液, 可以对不同体积, 不同数量的菌体, 进行平行裂菌, 以处理 1 g 菌体为例, 方法如下:

- 1) 准备 TBS 缓冲液: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 调整至 7.4。也可购买市售预制粉包, 溶解即可;
- 2) 按照比例, 向 1 g 湿菌中加入 9 ml TBS 缓冲液重悬, 随后加入 1 ml 铁锤超级裂菌液充分混匀 (1 L LB 培养基能够收获约 3 g 菌体)。
- 3) 常温裂解 5-10 min, 菌体裂解充分, 会看到菌体重悬液渐渐变清亮透明, 如果蛋白不稳定, 建议冰浴裂菌, 适当延长 10-30 min;
- 4) 8000 rpm 离心 10 min, 电泳检测全菌裂菌液与离心上清, 观察目的蛋白是否在离心上清中 (如在上清中, 则为可溶表达)。

2.6 磁珠与裂解液孵育

Anti-HA Magrose Beads 适配 pShakit 载体体系, 磁珠上的 Anti-HA 纳米抗体亲和力高、特异性好, 对 HA 标签蛋白结合载量高, 仅需磁力架即可快速完成目的蛋白的亲与捕获与酶切洗脱全过程, 操作便捷高效。如果配合磁分离设备, 可以快速完成通量纯化。1 ml 磁珠的结合载量 ≥ 8 mg/ml (测试蛋白为 EGFP, 26 kDa)。可根据裂菌液的蛋白可溶表达量, 加入对应量的磁珠。以下操作步骤以 100 μ l 磁珠体积为例进行介绍:

- 1) 准备 PBS 缓冲液: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 调整至 7.4。也可购买市售预制粉包, 溶解即可;
- 2) 磁珠清洗:
 - a. 将磁珠充分混匀后取 0.5 ml 磁珠混悬液(20%浓度, 实际磁珠量为 100 μ l, 可结合 0.8-1 mg 目的蛋白), 置于离心管中, 放磁力架上静置, 待磁珠完全吸附后, 吸弃上清;
 - b. 加入 500 μ l PBS 轻轻颠倒混匀, 将离心管置于磁力架上, 待磁珠完全吸附后, 吸弃上清;
 - c. 重复上述操作重复 2 次。

备注: 可根据样本量增加磁珠混悬液的体积 (1-5 ml 菌体裂解液加入 0.5 ml 磁珠混悬液; 5-10 ml 菌体裂解液加入 1 ml 磁珠混悬液)。

- 3) 样品孵育:
 - a. 向上述漂洗好的磁珠中加入 1-5 ml 菌体裂解液, 常温下孵育 30 min (建议在旋转混匀仪上孵育, 使样品和磁珠充分接触);
 - b. 孵育结束后, 将离心管置于磁力架上, 待磁珠全部吸附后, 将上清转移至新的离心管中, 留样备检;
 - c. 向离心管中加入 500 μ l PBS 缓冲液清洗, 轻轻颠倒混匀 5 次后将离心管置于磁力架上, 待磁珠完全吸附后弃去上清;
 - d. 重复上述清洗操作 3 次。

2.7 蛋白洗脱

- 1) 向清洗后的磁珠中加入 2 倍磁珠体积的 PBS 缓冲液进行重悬, 即 100 μ l 磁珠对应加入 200 μ l PBS 缓冲液混匀重悬;
- 2) 向上述磁珠悬液中加入 0.5 μ l Ulpase, 室温条件下孵育 30 min;
- 3) 孵育完成后, 将离心管放置于磁力架上, 待磁珠完全吸附聚集后, 吸取上清液转移至全新离心管中, 所得上清即为蛋白洗脱液;

以下为可选步骤 (可有效提升蛋白回收率):

- 4) 向管内磁珠中加入 100 μ l PBS 缓冲液重悬, 振荡孵育 2 min, 随后将离心管置于磁力架上, 待磁珠完全吸附后, 吸取上清液留存, 该上清中含有残留目的蛋白;
- 5) 重复上述步骤 3 次, 随着重复次数增加, 上清中目的蛋白含量会逐步降低, 可通过 SDS-PAGE 电泳检测或 OD280 吸光度检测判断。

经本方法纯化获得的目的蛋白无需进行换液处理, 可直接用于后续活性验证及其他后续实验操作。

备注: 100 μ l 磁珠体积加入 0.5 μ l Ulpase, 1 ml 磁珠体积加入 5 μ l Ulpase, 以此类推; 本步骤中采用 PBS 缓冲液重悬磁珠并非强制要求, 用户可根据目的蛋白的缓冲液适配需求自行更换重悬体系, 如 TBS 缓冲液等, 常规缓冲液替换不影响蛋白洗脱效果, 但需避免使用高盐缓冲液 (NaCl 浓度建议控制在 0.3 M 以内), 高盐环境会降低最终目的蛋白的纯度。

3. 注意事项

- 1) 本产品运输温度为 2-8 °C, 试剂盒组分中仅 Anti-HA Magrose Beads 需 2-8 °C 保存, 其余所有组分均需置于 -20 °C 环境下保存;
- 2) 本产品磁珠与洗脱液为配套专用组分, 若单独采购试剂盒组分, 需同时购买磁珠与洗脱液, 缺一不可, 否则无法完成蛋白洗脱实验;
- 3) Anti-HA Magrose Beads 不耐高盐, 且高盐条件会降低目的蛋白纯度, 建议磁珠重悬及洗脱全过程中盐浓度不超过 0.3 M;

- 4) 使用 pShakit 载体时需重点关注其 3' 端酶切位点, 不同酶切位点会影响蛋白 C 端标签类型, 但是无论选用何种酶切位点, 均可通过引入终止密码子制备无标签目的蛋白;
- 5) 本产品依托 HA 标签实现亲和纯化, 载体自带的 HA 标签可高效结合 Anti-HA Magrose Beads, 且无法通过常规洗脱方式直接洗脱, 因此**本产品不适用 HA 标签融合蛋白的制备**;
- 6) pShakit 载体 N 端携带 HA-Flag-Sumo 复合标签, 本试剂盒采用酶切洗脱方式制备目的蛋白, 酶切位点位于 Sumo 标签区域。因此洗脱过程中, 载体自带的 HA-Flag-Sumo 标签会完整留存于 Anti-HA Magrose Beads 上, 不会进入洗脱液, **最终获得的目的蛋白分子量较原始融合蛋白偏小 (差值约 24 KDa)**;
- 7) 本产品可适配除 HA 外的各类标签蛋白制备与纯化。除载体自带的 His、Strep 标签外, 用户可通过引物设计或全基因合成的方式, 将所需功能标签插入目的基因的 N 端或 C 端。**需特别注意 Flag 标签的使用**: 因载体固有 Flag 标签会随酶切洗脱残留于磁珠上, 若实验需要 Flag 标签, 需在全基因合成阶段将 DYKDDDDK 标签氨基酸序列自主插入目的基因的 N 端或 C 端, 该操作不会影响后续目的蛋白的纯化与回收效果;
- 8) 质粒构建所需的 PCR 高保真酶、DNA 回收试剂盒、T4 连接酶或者无缝克隆试剂盒、限制性内切酶等相关实验耗材, 以及 DH5 α 、BL21 (DE3) 感受态细胞均需用户自行准备;
- 9) 客户进行全基因合成时, 建议对目的基因进行大肠杆菌密码子优化, 可有效改善蛋白包涵体的问题。

4. 参考信息

pShakit 载体携带有绿色荧光蛋白基因, 可通过荧光颜色变化直观判断目的蛋白的流向。用户可将 pShakit 载体作为阳性对照, 参照本实验方法操作验证并监控整套蛋白纯化流程的稳定性与可靠性, 具体操作步骤如下:

- 1) 将 pShakit 载体转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 复苏后挑取单克隆菌落, 接种于 LB 培养基中, 进行菌种保种及后续蛋白表达实验;
- 2) 取表达菌株划线涂盘的培养皿, 挑取形状圆亮的单克隆, 接种至 4 ml 含有卡那霉素的 LB 培养基中, 进行过夜培养, 获得种子菌液;
- 3) 第二天, 按 1:200 比例进行菌种接种, 即取 4 ml 菌种接种至 800 ml LB 液体培养基中(需添加 Kanamycin 抗生素), 37 °C、220 rpm 条件下振荡培养 3 h;
- 4) 培养 3 h 后, 每 30 min 取样检测菌体 OD₆₀₀ 值, 待 OD₆₀₀ 值达到 0.6 左右, 加入终浓度 0.1 mM IPTG, 18 °C 低温诱导过夜;
- 5) 采用 18 ml Tris 缓冲液充分重悬菌体, 混匀后加入 2 ml 铁锤超级裂菌液, 室温条件下裂解 5 min, 直至菌液基本澄清透明;
- 6) 8000 rpm 离心 10 min, 分别收集上清液与菌体沉淀; 上清液可观察到明显绿色荧光, 表明目的蛋白实现高效可溶性表达;
- 7) 向上清液中加入 1 ml 预处理完成的 Anti-HA Magrose Beads, 室温振荡孵育 30 min, 使目的蛋白与磁珠充分结合;
- 8) 将混合混悬液置于磁力架上静置吸附, PBS 缓冲液清洗磁珠 3 次, 每次清洗后去上清;
- 9) 加入 2 ml PBS 缓冲液充分重悬磁珠, 混匀后加入 5 μ l Ulpase, 室温振荡孵育 30 min, 完成目的蛋白特异性酶切洗脱;
- 10) 将混悬液放置于磁力架上吸附分离, 收集上清液即为纯化后的目的蛋白, 洗脱液可观察到明显绿色荧光;
- 11) 向磁珠中加入 1 ml PBS 缓冲液重悬, 室温振荡孵育 2 min 后置于磁力架上分离, 收集含有残留蛋白的上清液; 该残留洗脱步骤重复操作 3 次, 最大限度回收残留目的蛋白;
- 12) 经 3 次回收洗脱后, 溶液中基本无绿色荧光残留。分别取原始样品、流穿液及最终洗脱液进行 OD₂₈₀ 浓度检测与 SDS-PAGE 电泳检测, 实验结果详见图 3。

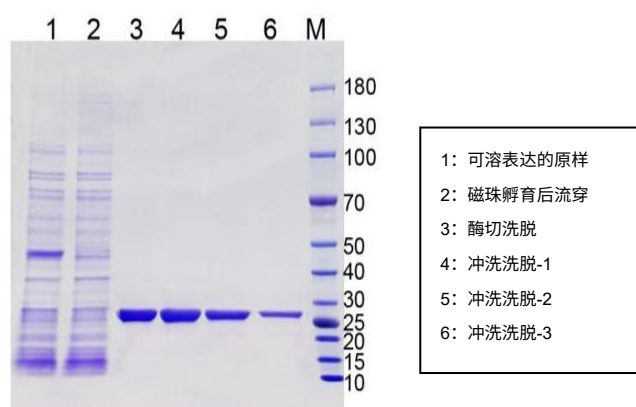


图 3. 摇瓶纯化 GFP 蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

图 3 表明 pShakit 载体重组表达的目的蛋白可实现高效可溶性表达, 借助 Anti-HA Magrose Beads 可完成一步亲和纯化, 所得 EGFP 荧光蛋白经电泳检测纯度可达 90 % 以上; 原样中蛋白大小 $\approx$ 50 KDa, 流穿中几乎没有目的蛋白残留, 酶切洗脱后的蛋白 $\approx$ 26 KDa; 以 800 ml 培养基体系进行培养纯化, 最终可获得总蛋白量 $\geq$ 8 mg。



5. 订购信息

名称	货号	规格
摇摇乐™ 原核蛋白表达和纯化试剂盒	BK0077-01	10 T
	BK0077-02	50 T
pShaKit	BR0152-01	10 µg
	BR0152-02	50 µg
Ulpase	BR0153-01	60 µl
	BR0153-02	300 µl
铁锤超级裂菌液	BR0005-01	10 ml
	BR0005-02	100 ml
	BR0005-03	1 L
	BR0005-04	2 ml
Anti-HA Magrose Beads	MA0701-01	1 ml
	MA0701-02	5 ml
	MA0701-03	25 ml

6. 相关产品

名称	货号	规格
pShaKit-BamH I /Xho I	BR0155-01	10 µg
	BR0155-02	100 µg
pShaKit-BamH I /HindIII	BR0156-01	10 µg
	BR0156-02	100 µg
DNA Assembly Cloning Kit	BK0024-01	50 rxn