

His-tag 琼脂糖磁珠使用说明书

【产品简介】

His-tag 琼脂糖磁珠具有超顺磁性，可高效、快速分离纯化含 6 个组氨酸标签的重组蛋白，适用于科研及工业用户简单、快速的分离纯化组氨酸标签的重组蛋白。

传统的镍柱琼脂糖层析介质，需要多次长时间的高速离心，滤膜过滤，层析设备纯化，才能得到目的蛋白。相比之下，磁珠不需要复杂的样本前处理，得到的蛋白混合液，只需与磁珠均与混合，目的蛋白即可特异性地与磁珠吸附，磁吸除去蛋白混合液，通过洗涤液清洗磁珠表面杂蛋白，洗脱液使目的蛋白与磁珠分离，即可得到高纯度目的蛋白。

【产品特性】

材质	琼脂糖，Fe ₃ O ₄
交联度	4%
粒径范围	20-100 μ m
金属离子密度	30-50 μ mol/mL
蛋白结合量 ¹	30 ~ 40mg/mL
颜色	黑色
表面修饰	NTA
配基	-N(CH ₂ COOH) ₃ (NTA)
pH 值范围	3-10，在位清洗时 pH 范围可到 2-11
化学稳定性	0.01 M HCl, 0.1 M NaOH, 10mM EDTA, 5mM DDT, 10mM β -巯基乙醇
避免使用试剂	螯合剂，如 EDTA、EGTA、柠檬酸等
固含量	20%v/v
保存条件	20%乙醇
保存温度	2 –8℃ 保存，请勿冷冻

注 1：磁珠蛋白结合量与蛋白的特性有关系，此处仅供参考。

注 2：1mL 磁珠悬浮液含 200 μ L 的琼脂糖磁珠

His-tag 琼脂糖磁珠与特定浓度化学试剂的相容性

试剂类型	试剂名称及浓度
变性剂	8 M 脲、6 M 盐酸胍

去污剂	2% Triton X-100、2% Tween-20、2% NP-40、2%胆酸盐、1% CHAPS
还原剂	5mM DTT, 10 mM β -巯基乙醇, 5mM TCEP
缓冲液组分	50mM 磷酸钠, pH7.4、100 mM Tris-HCl, pH7.4、100 mM Tris-acetate, pH7.4、100mM HEPES, pH7.4、100 mM MOPS, pH7.4、100 mM 醋酸钠, pH7.4
其它试剂	20%乙醇、50%甘油、0.1M Na ₂ SO ₄ 、1 mM EDTA、60 mM 醋酸

【适用范围】

适用于纯化细菌、酵母、昆虫和哺乳动物细胞等分泌或胞内表达的可溶性组氨酸标签蛋白，也可用于包涵体组氨酸标签蛋白的纯化。

【操作流程】

1 配制缓冲液

结合缓冲液：50mM 磷酸缓冲液（pH 7.4），500mM 氯化钠

蛋白洗涤液：50mM 磷酸缓冲液（pH 7.4），500mM 氯化钠，30-60mM 咪唑

蛋白洗脱液：50mM 磷酸缓冲液（pH 7.4），500mM 氯化钠，150-300mM 咪唑

蛋白酶抑制剂：100mM PMSF

磁珠保存液：20%乙醇

2 样本处理

本使用说明书根据不同类型的蛋白表达系统，提供三种样品处理方式。

（1）大肠杆菌、酵母菌表达胞内可溶性蛋白：收集的菌体加入适量的结合缓冲液重悬，加入终浓度为 1mM 的蛋白酶抑制剂，终浓度为 10% Triton-X100，在冰水浴的条件下，用超声波破碎仪超声菌体，超声结束后，用户可根据实际需要进行离心。

（2）胞外表达可溶性蛋白：取胞外表达上清，加入等量的结合缓冲液，即为蛋白粗样品。

（3）动物细胞胞内表达可溶性蛋白：收集动物细胞，用 PBS 缓冲液洗涤，用含有 1% Triton-X100 或 1%NP 40 的结合缓冲液重悬动物细胞，加入终浓度为 1mM 的蛋白酶抑制剂。

3 磁珠预处理

（1）根据蛋白的表达量，预估计磁珠的用量，例如，若蛋白表达量为 10-20mg，可用 5mL 磁珠纯化目的蛋白。

（2）5mL 磁珠置于 15mL 离心管中，加入 5ml 结合缓冲液，轻轻上下翻转离心管 3-5 次重悬磁珠，用磁性分离器磁吸磁珠，待液体完全澄清后，缓慢倾倒结合缓冲液，重复操作洗涤 2 次。

4 蛋白纯化

（1）依据“样本处理”的实验方案得到的蛋白粗样品，加入到预处理后的磁珠中，并用涡旋混匀器分散磁珠。

（2）将离心管置于旋转混合仪，在室温条件下，旋转混合 30 分钟，若蛋白易发生降解，则将旋转混合仪置于

2-8℃冰箱，旋转混合 60 分钟。

- (3) 将离心管用磁性分离器磁吸，待液体完全澄清后，缓慢倾倒蛋白粗样品。
- (4) 在离心管中，加入 5mL 蛋白洗涤液，轻轻上下翻转离心管 3-5 次，重悬磁珠，用磁性分离器磁吸，待液体完全澄清后，缓慢倾倒蛋白洗涤液，重复操作洗涤四次。
- (5) 在离心管中，加入 1mL 蛋白洗脱液，轻轻上下翻转离心管 3-5 次，重悬磁珠，用磁性分离器磁吸，带液体完全澄清后，用 1mL 移液枪将蛋白洗脱液移取至 1.5mL 离心管中，并用蛋白测定仪检测蛋白浓度，按以上步骤，重复操作，直至蛋白测定仪检测不到蛋白。

5 磁珠后处理

- (1) 在离心管中，加入 5mL 蛋白洗涤液，重悬磁珠，用磁性分离器磁吸，待液体完全澄清后，缓慢倾倒蛋白洗脱液，重复操作 3 次。
- (2) 在离心管中，加入 5mL 磁珠保存液，并放至 2-8℃冰箱保存。

6 磁珠再生

镍离子洗脱液：100mM EDTA

镍离子结合液：0.1M 硫酸镍

磁珠保存液：20%乙醇

- (1) 磁珠连续使用 3-5 次后，可能会造成蛋白纯化效率的下降，此时需要对磁珠进行脱镍处理，磁珠重新结合镍离子。
- (2) 5mL 镍离子洗脱液加入到重复使用的磁珠中，重悬磁珠，用磁性分离器磁吸，待液体完全澄清后，缓慢倾倒镍离子洗脱液。
- (3) 5mL ddH₂O 加入到磁珠中，重悬磁珠，用磁性分离器磁吸，待液体完全澄清后，缓慢倾倒 ddH₂O，重复操作 3 次。
- (4) 加入 10mL 镍离子结合液，重悬磁珠，在室温下，用旋转混合仪混匀 20-30 分钟，用磁性分离器磁吸，待液体完全澄清后，缓慢倾倒镍离子结合液。
- (5) 5mL ddH₂O 加入到磁珠中，重悬磁珠，用磁性分离器磁吸，待液体完全澄清后，缓慢倾倒 ddH₂O，重复操作至液体澄清。
- (6) 加入 5mL 磁珠保存液，并放至 2-8℃冰箱保存。

【蛋白纯化流程优化】

以上操作纯化流程，适用于大部分组氨酸标签蛋白纯化，不同的组氨酸标签蛋白质，与金属离子的螯合能力不一样，可适当对纯化流程进行优化，可从以下几方面优化，以提高目标蛋白的回收率和纯度。

提高目的蛋白回收率

- 1、提升蛋白酶抑制剂的用量
- 2、增加蛋白与磁珠结合的时间
- 3、增加磁珠的使用量
- 4、若遇到还原性蛋白，可以在缓冲液中添加适量的 DTT，防止蛋白纯化过程中，出现沉淀。

提高目的蛋白纯度

- 1、经 SDS-PAGE 电泳鉴定，目的蛋白有较多杂带，建议增加提高洗涤液中的咪唑浓度，或者增加洗涤的次数。
- 2、采用梯度浓度的咪唑洗脱目的蛋白，优化洗脱目的蛋白的咪唑浓度。
- 3、在蛋白粗样品中加入少量表面活性剂。

包涵体蛋白的纯化

- 1、若重组蛋白表达为包涵体，在菌体超声破碎时，结合缓冲液中加入 8M 尿素。
- 2、包涵体蛋白纯化，在洗涤缓冲液中加入 1.5M 尿素进行洗涤。
- 3、包涵体蛋白纯化，在洗脱缓冲液中加入 8M 尿素进行洗脱。

【注意事项】

- 1、首次使用产品，请参考用户使用手册。
- 2、磁珠使用和保存，切勿冷冻、干燥或高速离心。
- 3、磁珠使用次数过多，蛋白纯化效率会降低，建议磁珠重生。
- 4、在使用过程中，磁珠要充分分散在缓冲液中。
- 5、为了避免磁珠的损失，磁性分离器磁吸时，要待液体完全澄清后，才可倾倒液体。
- 6、磁珠可对同种蛋白进行多次纯化使用，若是不同种蛋白纯化，建议使用新的磁珠。
- 7、本产品需要配合磁性分离器使用。
- 8、本产品仅供科研使用。

【基本信息】

企业名称： 深圳微著科磁科技有限公司
地 址： 深圳市南山区学苑大道 1001 号南山智园 A7 栋 903

版权所有 © 深圳微著科磁科技有限公司

本说明书（包括但不限于文字、图片、图标、设计、商标等）的全部知识产权归深圳微著科磁科技有限公司所有。未经本公司书面许可，任何单位或个人不得以任何方式或理由对本说明书内容进行复制、修改、传播、出版、翻译或用于其他商业用途。

对于侵犯本公司知识产权的行为，本公司将依法追究其法律责任。