

## HisSep Ni-NTA MagBeads His 标签蛋白纯化磁珠

### 产品信息

产品名称	产品编号	规格
HisSep Ni-NTA MagBeads His 标签蛋白纯化磁珠	20561ES03	1 mL
	20561ES08	5 mL
	20561ES25	25 mL
	20561ES60	100 mL

### 产品描述

His-tag 蛋白纯化磁珠是一种高容量的新型磁性微球产品，用于快速、高效的纯化 His 标签融合蛋白。磁珠在磁场作用下直接从生物样品中可一步纯化出高达 95%纯度的目的蛋白，极大的简化了纯化工艺和提高纯化效率。将含有 His 标签蛋白的细胞裂解物添加到 MagBeads 中，让蛋白质与其充分结合，然后可从磁珠中洗脱分离出目的蛋白。

与传统柱层析方法相比，使用磁珠纯化 His 标签蛋白无需控制上样流速和多次离心样品，也不需要昂贵的层析和离心设备。样品与磁珠的结合以及目的蛋白与磁珠的分离简单、快捷，而且更容易实现高通量、自动化的蛋白纯化方法。适合科研和工业客户高通量地进行组氨酸标签蛋白的纯化。

该磁珠以 4%琼脂糖凝胶为基质通过化学方法偶联了四配位的氮川三乙酸(NTA)，螯合镍离子(Ni<sup>2+</sup>)后，可以形成非常稳定的八面体结构，镍离子处于八面体的中心，这样的结构很有效的保护了镍离子免受小分子的进攻更加稳定。

His 标签蛋白纯化磁珠广泛适用于细菌、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，也可用于变性蛋白的纯化（包涵体需变性后再进行纯化）。

### 产品性质

基质	磁性琼脂糖微球
载量	> 40 mg 6×His-tagged protein/mL 磁珠
粒径	30-100 μm
磁珠浓度	磁珠悬浮于保护液中，含量为 20% (V/V)
储存缓冲液	含 20%乙醇的 1×PBS

### 运输和保存方法

冰袋运输。4°C长期储存，有效期 2 年。

### 注意事项

- 磁珠保存过程中避免冷冻、干燥和高速离心等操作。
- 磁珠使用前，请充分震荡，使磁珠保持均匀的悬浮状态。
- 使用过的磁珠重复使用时，建议纯化同一种蛋白，纯化不同种蛋白时，建议使用新磁珠，以避免交叉污染。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 本产品仅作科研用途！

### 使用方法

#### 一、缓冲液配制

- 缓冲液使用基本原理：低咪唑上样，高咪唑洗脱，或者高 pH 上样，低 pH 洗脱。
- Buffer 在使用前最好用 0.22 μm 或者 0.45 μm 滤膜过滤除菌。

3.可溶性蛋白纯化所需缓冲液及配方详见附表 1，包涵体蛋白纯化所需缓冲液及配方详见附表 2 和表 3。

## 二、样本制备

### 2.1 细菌或酵母表达的蛋白

1) 将培养液转移到离心杯中，7,000 rpm (7,500 xg)，离心 15 min 收集菌体，然后按照菌体：Lysis Buffer=1:10 (W/V) 加入 Lysis Buffer，加入终浓度为 1 mM 的 PMSF。同时可加入其他蛋白酶抑制剂，但不能影响目的蛋白与磁珠的结合。

2) 加入溶菌酶,使其工作浓度为 0.2-0.4 mg/mL。如果表达的宿主细胞内含 pLysS 或 pLysE，可以不加溶菌酶。

3) 将菌体沉淀悬浮起来，（如果菌液浓度高，也可考虑加入 10 μg/mL RNase A 和 5 μg/mL DNase I），混匀，冰上超声破碎细胞，至菌液基本保持澄清。

4) 将澄清的破碎液转移至离心管中，10,000 rpm (15,000 xg)，4°C 离心 20-30 min。取上清，置于冰上备用或-20°C 保存。

### 2.2 酵母、昆虫和哺乳细胞分泌表达可溶性蛋白

1) 将细胞培养液转移至离心杯中，5,000 rpm (3,800 xg)，离心 10 min，收集菌体得上清，如上清中不含 EDTA、组氨酸和还原剂等物质，即可直接使用；如含有 EDTA、组氨酸和还原剂等物质，需用 Lysis Buffer 透析才能上样。

2) 对于大量体积的上清，需加入硫酸铵沉淀浓缩后，然后用 Lysis Buffer 透析后才能上样。

### 2.3 包涵体蛋白纯化（变性条件）

1) 将培养液转移到离心杯中，7,000 rpm (7,500 xg)，离心 15 min 收集菌体，去掉上清。

2) 按照菌体：Lysis buffer（不含 8M 尿素）=1:10 (W/V)将菌体悬浮起来，混匀，冰浴超声破碎。

3) 将破碎液转移至离心管中，10,000 rpm (15,000 xg)，4°C 离心 20-30 min。去掉上清，步骤 2 和 3 可以重复一次。

4) 按照菌体：Lysis buffer（含 8M 尿素）=1:10 (w/v)的比例将包涵体充分悬浮。

## 三、磁珠预处理

### 3.1 准备

将磁珠充分混匀，使用移液器取适量的磁珠悬浮液，置于离心管中，将离心管置于磁力架上，待溶液变澄清后，用移液器吸弃上清。

### 3.2 平衡

将离心管从磁力架上取下来，加入与悬浮液等体积的 Lysis Buffer，使用枪头反复吹打 5-10 次，将离心管置于磁分离器上，待溶液变澄清后，用移液器吸弃清液，重复洗涤 2 次。

## 四、磁珠与目的蛋白结合

### 4.1 结合

将含有目的蛋白的上清液加入到处理好的磁珠中，颠倒混匀。将离心管置于混合仪上，室温旋转孵育 30 min（如果目标蛋白不稳定，建议 2-8°C 下孵育 1 h）。

### 4.2 洗杂

将离心管置于磁分离器，待溶液变澄清后，用移液器移出上清液，保留上清液，以备取样检测。向离心管中加入 2 倍悬浮液体积的 Wash Buffer，使用枪头反复吹打 5-10 次，将离心管置于磁分离器上，待溶液变澄清后，用移液器吸取上清液，保留，以备取样检测。重复上述步骤 2 次。

### 4.3 洗脱

建议将 3-5 倍磁珠体积的 Elution Buffer 加入到离心管中，使用移液器轻轻吹打 3-5 次，混匀，将离心管置于磁分离器上，待溶液变澄清后，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，以提高目的蛋白的回收量。用户也可根据实验结果调整缓冲液中的咪唑浓度。

## 五、磁珠保存

1. 向装有磁珠的离心管中加入 1 mL Elution Buffer，用移液器反复吹打 3-5 次，使磁珠充分悬浮，然后置于磁分离器，吸弃上清，重复该操作 2 次。

2. 向离心管中加入 1 mL 去离子水，用移液器反复吹打 3-5 次，使磁珠充分悬浮，然后置于磁分离器，吸弃上清，重复该操作 2 次。

3. 向离心管中加入含 20%乙醇的 1×PBS，使总体积为磁珠初始悬浮液体积，保存于 2-8 °C。

## 六、SDS-PAGE 检测

将纯化得到的样品（包括原始样品、流出组分、洗杂及洗脱组分）使用 SDS-PAGE 检测纯化效果。

表 1. 可溶性 His 标签蛋白纯化所需缓冲液及配方

缓冲液名称	配方	配制 1L 溶液所需各种试剂量	
Lysis Buffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	7.80 g
	300 mM NaCl	NaCl	17.54 g
	10 mM imidazole	Imidazole	0.68 g
	NaOH 调 pH 至 8.0, 0.22 μm 或 0.45 μm 过滤除菌		
Wash Buffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	7.80 g
	300 mM NaCl	NaCl	17.54 g
	20 mM imidazole	Imidazole	1.36 g
	NaOH 调 pH 至 8.0, 0.22 μm 或 0.45 μm 过滤除菌		
Elution Buffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	7.80 g
	300 mM NaCl	NaCl	17.54 g
	250 mM imidazole	Imidazole	17.0 g
	NaOH 调 pH 至 8.0, 0.22 μm 或 0.45 μm 过滤除菌		

以上缓冲液适用于多数 His 标签蛋白的纯化，客户也可根据实验结果调整缓冲液中的咪唑浓度。

表 2. 包涵体 His 标签蛋白纯化所需缓冲液及配方,pH 洗脱方式

缓冲液名称	配方	配制 1L 溶液所需各种试剂量	
Lysis Buffer	8 M Urea	Urea	480.50 g
	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	13.80 g
	100 mM Tris·HCl	Tris·Cl	12.10 g
	盐酸溶液调 pH 至 8.0, 0.22 μm 或 0.45 μm 过滤除菌		
Wash Buffer	8 M Urea	Urea	480.50 g
	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	13.80 g
	100 mM Tris·HCl	Tris·Cl	12.10 g
	盐酸溶液调 pH 至 6.3, 0.22 μm 或 0.45 μm 过滤除菌		
Elution Buffer	8 M Urea	Urea	480.50 g
	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	13.80 g
	100 mM Tris·HCl	Tris·Cl	12.10 g
	盐酸溶液调 pH 至 4.5, 0.22 μm 或 0.45 μm 过滤除菌		

表 3. 包涵体 His 标签蛋白纯化所需缓冲液及配方,咪唑洗脱方式

缓冲液名称	配方	配制 1L 溶液所需各种试剂量	
Lysis Buffer	8 M Urea	Urea	480.50 g
	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	7.80 g
	300 mM NaCl	NaCl	17.54 g
	10 mM imidazole	Imidazole	0.68 g
	NaOH 调 pH 至 8.0, 0.22 μm 或 0.45 μm 过滤除菌		
Wash Buffer	8 M Urea	Urea	480.50 g
	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	7.80 g
	300 mM NaCl	NaCl	17.54 g
	20 mM imidazole	Imidazole	1.36 g
	NaOH 调 pH 至 8.0, 0.22 μm 或 0.45 μm 过滤除菌		

Elution Buffer	8 M Urea	Urea	480.50 g
	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	7.80 g
	300 mM NaCl	NaCl	17.54 g
	250 mM imidazole	Imidazole	17.0 g
	NaOH 调 pH 至 8.0, 0.22 μm 或 0.45 μm 过滤除菌		

表 4. Ni NTA Magarose Beads 试剂耐受情况

试剂种类	浓度
还原剂	5 mM DTE
	1 mM DTT
	20 mM β-mercaptoethanol
	5 mM TCEP
	10 mM reduced glutathione
变性剂	8 M urea
	6 M Gua-HCl
去污剂	2% Triton™ X-100, nonionic
	2% Tween™20, nonionic
	2% NP-40, nonionic
	2% Cholate, anionic
	1% CHAPS, zwitterionic
其他类	500 mM imidazole
	20% ethanol
	50% glycerol
	100 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	1.5 M NaCl
	1 mM EDTA
60 mM citrate	