

His标签蛋白纯化琼脂糖磁珠

Ni-IDA Magnetic Agarose Beads

本产品 4℃运输；保存于 4℃, 禁止产品冻结, 长期存放请保证试剂管竖立向上, 保质期 24 个月。

货号规格

货号	规格
YJ106	1 mL×5

产品简介

His 标签蛋白纯化琼脂糖磁珠是一种新型功能化材料, 用于高效、快速纯化 His 标签融合蛋白, 可通过磁性分离方式直接从生物样品中一步纯化出高纯度的目标蛋白, 操作起来简便高效。

产品参数

项目	参数
基质	高度交联的 4% 琼脂糖微球
螯合物	Ni ²⁺
载量	> 20 mg 6×His 蛋白
粒径	30~100 μm
耐压流速	80~150 cm/h (0.3 MPa, 3 bar)
浓度	凝胶体积占悬浮液体积的 50%
储存缓冲液	含 20% 乙醇的 1×PBS

自备试剂

缓冲液	推荐配方
平衡缓冲液	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0
漂洗缓冲液	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0
洗脱缓冲液	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0

注：① 所用去离子水和缓冲液在使用前建议用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤, 减少杂质, 以提高蛋白纯化效率;

② 上述缓冲液适用多数 His 标签蛋白纯化, 平衡缓冲液中加入一定咪唑有助于降低非特异性结合, 用户也可根据实验结果调整缓冲液中的咪唑浓度。

操作步骤

样本处理 (以大肠杆菌表达系统为例)

1. 离心收集大肠杆菌 (4°C, 4,000×g, 30 min), 弃上清;
2. 用冷平衡缓冲液重悬细胞, 同时加入蛋白酶抑制剂 (货号: GRF101);
注: 所用试剂中不能含有 EDTA、EGTA 等螯合剂, DTT、巯基乙醇等还原剂, 尿素、盐酸胍等变性剂。
3. 用超声波破碎法在冰上破碎菌体, 直到样品破碎完全;
4. (可选) 如果裂解物太过粘稠, 可以加入 RNase A (终浓度 10 µg/mL) 和 DNase II (终浓度 5 µg/mL) 并在冰上孵育 10~15 min;
5. 离心收集上清 (4°C, 12,000×g, 20 min);
6. SDS-PAGE 分析 His 融合蛋白的含量及可溶性;

磁珠预处理

7. 将 His 标签蛋白纯化琼脂糖磁珠 颠倒数次, 使其充分混匀, 取所需量的磁珠悬液, 转移至离心管中, 接着在磁力架上静置 1 min, 待磁珠吸附到离心管侧壁上后, 吸弃上清;
8. 加入与琼脂糖磁珠等体积的冷 平衡缓冲液, 用移液器反复吹打 5~10 次, 接着在磁力架上静置 1 min, 待磁珠吸附到离心管侧壁上后, 吸弃上清;
9. 重复步骤 8 两次;

磁珠与目的蛋白结合

10. 结合: 将步骤 5 制备好的含有 His 融合蛋白的上清液加入预处理好的磁珠, 置于翻转混合仪上孵育 (常温 30 min, 也可置于 2~8°C 孵育 1 h 或者过夜), 接着在磁力架上静置 1 min, 待磁珠吸附到离心管侧壁上, 溶液变澄清后, 把上清液转移到新的离心管中备用 (上清液可用于检测抗体是否存在残留), 离心管中剩余的即为 目的蛋白 - 磁珠复合物;
11. 漂洗: 在上一步得到的 目的蛋白 - 磁珠复合物 中加入 2 倍琼脂糖磁珠体积的 漂洗缓冲液, 用移液器反复吹打 5~10 次, 接着在磁力架上静置 1 min, 待磁珠吸附到离心管侧壁上, 溶液变澄清后, 吸弃上清。再重复此步骤两次;

洗脱

12. 向洗涤后的 目的蛋白 - 磁珠复合物 中加入 2~5 倍琼脂糖磁珠体积的 洗脱缓冲液, 置于翻转混合仪上孵育 (常温 5~10 min), 接着在磁力架上静置 1 min, 待磁珠吸附到离心管侧壁上, 溶液变澄清后, 吸取上清, 收集洗脱组分, 即为目的蛋白;

磁珠保存

13. 向使用后的琼脂糖磁珠中加入 1~3 倍其体积的 洗脱缓冲液, 用移液器反复吹打 5 次, 使磁珠彻底重悬, 接着在磁力架上静置 1 min, 待磁珠吸附到离心管侧壁上, 溶液变澄清后, 吸弃上清。再重复此步骤两次;
14. 向离心管中加入 1~3 倍琼脂糖磁珠体积去离子水, 用移液器反复吹打 5 次, 使磁珠彻底重悬, 接着在磁力架上静置 1 min, 待磁珠吸附到离心管侧壁上, 溶液变澄清后, 吸弃上清。再重复此步骤两次;
15. 在琼脂糖磁珠中加入 20% 乙醇, 使总体积等于初始悬浮液体积, 置于 4~8°C 保存。

注意事项

1. 琼脂糖磁珠使用前应充分混匀；
2. 琼脂糖磁珠应保存在储存溶液中, 防止干燥；
3. 请勿将琼脂糖磁珠冷冻或离心, 以免引起不可逆聚集；
4. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作；
5. 本产品仅限科研使用。

常见问题解析

问题描述	可能原因	解决方案
洗脱组分中没有目的蛋白	目的蛋白可能是包涵体, 上清无蛋白	可以通过电泳检测蛋白提取上清中是否含有目的蛋白, 包涵体蛋白需要按照相应纯化方式处理
	目的蛋白表达量太低	优化表达条件
	目的蛋白结合比较弱, 在漂洗步骤被洗脱丢失	提高漂洗缓冲液的 pH 值, 或者降低咪唑的浓度
	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
	目的蛋白不能有效地从琼脂糖凝胶填料上洗脱下来	降低洗脱缓冲液的 pH 值, 或者增加洗脱缓冲液中咪唑的浓度 使用 10~100 mM EDTA 溶液剥离镍离子, 同时得到目的蛋白
回收的重组蛋白纯度不够	漂洗不彻底	增加漂洗缓冲液的用量
	样品中含有其它His标签蛋白	①通过调节 pH 值, 或者咪唑浓度来优化漂洗条件 ②通过使用其它纯化方式 (如离子交换, 疏水等) 进一步纯化洗脱组分
上样过程中蛋白发生沉淀	蛋白浓度太高	适当稀释蛋白
	操作温度太低	室温下进行上样
	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