

Biolinkedin® His 标签蛋白琼脂糖磁珠 (IDA-Ni)

包装清单

名称	货号	包装
His 标签蛋白 琼脂糖磁珠 (IDA-Ni)	L-2003	2mL (1mL 实体积)
	L-2003A	10mL (5mL 实体积)
	L-2003B	25mL (12.5mL 实体积)

产品概述

Biolinkedin® His 标签蛋白琼脂糖磁珠 (IDA-Ni) 是专为高效、快速纯化 His 标签蛋白而设计的新型磁性微球产品，可以在磁场作用下直接从生物样品中一步纯化出高纯度的目标蛋白，极大的简化了纯化工艺和提高纯化效率，适合科研和工业客户高通量地进行 His 标签蛋白的纯化。

与传统的柱层析方法相比，使用 His 标签蛋白琼脂糖磁珠无需控制上样流速，更不需要昂贵的层析设备和离心设备，样品与磁珠的结合以及目的蛋白与磁珠的分离变的非常简单、快捷，而且更容易实现高通量、自动化的蛋白纯化方法。

Biolinkedin® His 标签蛋白琼脂糖磁珠 (IDA-Ni) 可以用于各种表达来源（如大肠杆菌、酵母、昆虫细胞和哺乳动物细胞）的组氨酸标签（6xHis-tag）蛋白的纯化。它是由高度交联的 4% 琼脂糖磁珠为基质，通过化学方法偶联了三配位的亚氨基二乙酸 (IDA)，螯合镍离子 (Ni^{2+}) 后，可以形成比较稳定的平面四边形结构，从而有更多的位点与组氨酸标签上的咪唑环继续配位，达到结合目的蛋白的效果。

产品特性

基质	高度交联的 4% 磁性琼脂糖磁珠
载量	>20mg 6xHis 蛋白
配体	亚氨基二乙酸 (IDA)
螯合金属离子	Ni^{2+}
粒径	30~100 μm
耐压流速	80~150cm/h (0.3MPa, 3bar)
磁珠浓度	磁珠体积占悬浮液体积的 50%
储存缓冲液	含 20% 乙醇的 1xPBS
保质期	在 2~8°C 稳定保存两年

操作流程

1. 准备 buffer

结合/平衡缓冲液、洗涤缓冲液和洗脱缓冲液等缓冲液请自行准备或购买我司 His 标签蛋白纯化试剂盒。

2. 样品准备

以大肠杆菌表达系统，500mL 诱导菌液为例。

- 1) 4°C 离心 30min (4000xg) 收集菌体，弃上清。
- 2) 用预冷结合/平衡缓冲液重悬菌体，如果需要，可加入适量的抑制剂，如蛋白酶抑制剂 (PMSF) 或其他蛋白酶抑制剂等。

注意：加入的抑制剂不能对 His 标签蛋白琼脂糖磁珠 (IDA-Ni) 的性能有影响，破碎液中不能含有 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。

可选：如果裂解物太粘稠，可以加入 RNase A (终浓度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和 DNase I (终浓度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 并在冰上孵育 10~15min。

- 4) 4°C 离心 20min (12,000xg)，分离上清和沉淀，并过滤除杂。将上清和沉淀留样以备后续检测。

2. 纯化重组 His 标签融合蛋白

- 1) 将 His 标签蛋白琼脂糖磁珠 (IDA-Ni) 充分混匀，取 2mL 磁珠悬浮液，置于 50mL 离心管中，再加入 10mL 结合/平衡缓冲液，充分混匀后，磁性分离，弃上清，重复上述步骤 1 次。

- 3) 将制备好的含有 His 标签的融合蛋白上清加入到处理好的磁珠中，混匀后将离心管置于混匀仪上，室温孵育 1~2h。(也可置于 2~8°C 孵育 2~4h 或者过夜)

- 4) 孵育结束后，将离心管置于磁力架上，磁性分离，吸取上清，作为流穿，置于 2~8°C，以备后续检测。向离心管中加入 15mL 洗涤缓冲液，置于混匀仪混匀 10~15min，然后磁性分离，吸取上清 (保留，以备取样检测)。重复上述步骤 3 次。

5) **常规洗脱**: 加入 1mL **洗脱缓冲液**, 吹打混匀 10~20 次后, 通过磁力架分离上清至 1.5mL 的 Ep 管收集, 重复操作, 分别收集 5~10 管洗脱液。

备注: 如需优化洗脱步骤, 也可采用梯度洗脱方式。

梯度洗脱: 采用不同浓度咪唑分别进行洗脱, 并收集洗脱液。

6) SDS-PAGE 检测

将得到的样品 (包括流穿、洗涤液和洗脱液) 以及原始样品使用 SDS-PAGE 检测纯化效果。加入适量**蛋白快速染色液**浸没 PAGE 胶, 然后置于摇床上摇动, 染色 10~30min 即可观测结果。

注: 目的蛋白保存前应透析或者超滤以去除咪唑等杂质。再分装冻存到 -80°C。

(可选) 磁珠再生及储存

磁珠再生步骤请参考或直接购买我司 His 标签蛋白纯化再生试剂盒。

磁珠再生后, 可以立即使用, 如不立即使用需加入等体积 20%乙醇, 置于 2~8°C 保存。

相关产品

货号	产品名称
L-2003	His 标签蛋白琼脂糖磁珠 (IDA-Ni)
L-2012	His 标签蛋白琼脂糖磁珠 (NTA-Ni)

问题解决

问题	原因	解决方案
洗脱液中 没有 目的蛋白	蛋白可能是包涵体, 上清无蛋白	可以通过电泳检测裂解液分析上清中是否含有目的蛋白, 包涵体蛋白需要按照包涵体蛋白的纯化方式。
	表达量太低	优化表达条件
	目的蛋白结合比较弱, 在洗杂步骤被洗下来了	降低咪唑浓度。
	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, 如 PMSF。
纯化的目的蛋白不纯	目的蛋白不能有效地从磁珠上洗脱下来	增加其中咪唑浓度 使用 10~100mM EDTA 溶液剥离镍离子, 同时得到目的蛋白
	洗杂不彻底	增加洗涤次数。
结合过程中蛋白发生沉淀	浓度太大	适当稀释蛋白
	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。
	操作温度太高	2~8°C 下操作。