

## His标签蛋白纯化试剂盒(IDA-Ni琼脂糖磁珠)

产品编号	产品名称	包装
P2245S	His标签蛋白纯化试剂盒(IDA-Ni琼脂糖磁珠)	10ml

### 产品简介:

- 碧云天生产的His标签蛋白纯化试剂盒(IDA-Ni琼脂糖磁珠)(His-Tag Protein Purification Kit with IDA-Ni Magnetic Agarose Beads), 即IDA-Ni His标签蛋白纯化试剂盒, 也称组氨酸标签蛋白纯化试剂盒, 俗称镍柱试剂盒, 是一种采用了新型BeyoMag™ His标签蛋白纯化琼脂糖磁珠(IDA-Ni), 可以兼容高浓度变性剂(8M尿素或6M盐酸胍), 并能简单、快速、灵活、高效并且高特异性地在非变性或变性条件下纯化His标签蛋白的试剂盒。
- 本试剂盒中的IDA-Ni琼脂糖磁珠, 也称IDA-Ni琼脂糖磁珠(Magarose)、IDA-Ni磁珠或IDA镍磁珠, 由高质量的亚氨基二乙酸(Iminodiacetic acid, IDA)共价偶联至琼脂糖磁珠, 再通过IDA的3个结合位点螯合二价镍离子( $Ni^{2+}$ )制备而成, 配合优化过的缓冲液, 可特异性地与动植物或者微生物裂解液、血清、腹水等样品中含有His标签的蛋白结合, 从而用于带有His标签蛋白或蛋白复合物的纯化、免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP)或免疫共沉淀(Co-IP)。
- His标签(His-tag)、Flag标签(Flag-tag)、Myc标签(Myc-tag)、HA标签(HA-tag)和GST标签(GST-tag)等是最常见的一些标签, 通过与这些标签的融合表达可以非常方便地检测目的蛋白及与目的蛋白相互结合的蛋白, 也可以非常方便地用于目的蛋白的纯化。
- His-tag是6个连续的组氨酸残基(HHHHHH)组成的多肽, 通过基因重组技术把His-tag的核酸序列与目的基因的5'端或3'端连接, 表达形成融合His-tag的目的蛋白。His-tag具有以下优点: His-tag分子量非常小, 只有0.84kDa, 通常不会与目的蛋白相互作用, 并且大多数情况下不会影响目的蛋白的功能, 通常不会形成二聚体, 并对蛋白的下游应用没有影响; His-tag作为标签蛋白, 后续通过His标签抗体对目的基因的表达、定位及功能进行检测, 也可以通过His标签蛋白纯化琼脂糖磁珠或常规的His标签蛋白纯化介质对目的蛋白进行纯化、免疫沉淀或免疫共沉淀等; 蛋白纯化步骤简便, 纯化条件温和, 且蛋白纯化完之后可以不必切除His标签, 很多情况下也不会对蛋白的功能产生影响; 可应用于多种蛋白表达系统, 也可以和其它的亲和标签一起构建双亲和标签表达; N-端的His-tag与细菌的转录翻译机制兼容, 有利于蛋白表达。基于以上优点, His标签已被广泛应用于蛋白表达、纯化、鉴定、相互作用和功能等多方面的研究[1]。一般使用His标签蛋白纯化介质(镍柱)对His标签蛋白进行纯化, 但对于带有His标签蛋白或蛋白复合物的少量纯化或免疫沉淀等应用, His标签蛋白纯化琼脂糖磁珠更简单、便捷。
- 本试剂盒中的琼脂糖磁珠是基于固定化金属离子亲和层析(Immobilized metal affinity chromatography, IMAC)技术研发而成。一个镍离子有六个配位位点, 其与琼脂糖或琼脂糖磁珠相连接的桥梁通常是IDA (Iminodiacetic acid, 亚氨基二乙酸)、NTA (Nitrilotriacetic acid, 次氨基三乙酸)或TED (Tris (carboxymethyl) ethylenediamine, 三羧甲基乙二胺)等螯合剂。IDA、NTA和TED分别拥有3、4、5个配位位点与镍离子结合, 这样镍离子空余的能与组氨酸标签结合的位点为3、2、1个, 所以IDA与His标签蛋白结合力相对最强, 载量最高, 但特异性较弱, 可用低浓度的咪唑进行高效洗脱, 而TED则相反。NTA与His标签蛋白的作用介于两者之间[2]。
- His标签蛋白纯化试剂盒(IDA-Ni琼脂糖磁珠)可在非变性或变性条件下特异性地结合His标签融合蛋白, 并可以借助磁力架等磁分离设备非常便捷地用于带有His标签的融合蛋白或其蛋白复合物的纯化或免疫沉淀等。本试剂盒的工作原理与操作流程请参考图1。

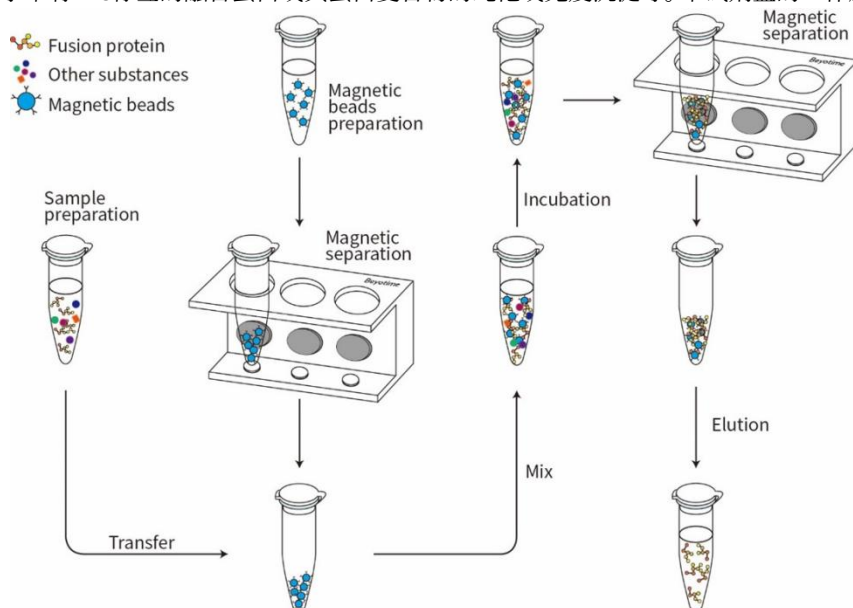


图1. 碧云天His标签蛋白纯化试剂盒(IDA-Ni琼脂糖磁珠) (P2245)工作原理与操作流程图。

- **本试剂盒使用便捷, 提供了配套试剂。**试剂盒提供了His标签蛋白纯化所需的相关试剂, 为His标签蛋白的纯化带来了极大的便利。同时磁珠产品储存在特殊保护液中, 不含甘油, 配合试剂盒提供的缓冲液, 可以通过磁性吸附实现快速高效的分离纯化, 无需离心操作。
- **本试剂盒用途广泛, 非变性和变性条件都可以使用。**本试剂盒不仅可以用于在非变性条件纯化His标签蛋白, 也可用于在变性条件纯化His标签蛋白。本试剂盒提供了非变性和变性条件下纯化His标签蛋白所需的不同的裂解液、洗涤液和洗脱液, 可以很好地满足不同实验的需要。很多情况宜优先选择非变性条件进行目的蛋白的裂解。如果发现非变性条件目的蛋白的裂解效果欠佳, 但目的蛋白的表达量能达到预期时, 首先宜考虑调整目的蛋白的诱导表达条件, 例如调整IPTG等诱导剂的浓度和诱导时的温度等。如果调整诱导条件后在非变性条件下仍然裂解效果欠佳, 此时宜考虑选择变性条件进行裂解、洗涤和洗脱。
- **变性条件溶解性好, 洗脱样品可以直接PAGE检测。**试剂盒配套提供的变性裂解液、变性洗脱液和变性洗涤液中均含有8M尿素, 可以有效促使蛋白变性和溶解; 最终洗脱下来的目的蛋白无需透析即可用于PAGE检测。最终纯化获得的目的蛋白可以通过透析去除尿素后用于后续特定用途。
- **本试剂盒稳定性高、特异性强、靶蛋白结合量高。**与国内外大多数的同类产品相比, 本试剂盒中的IDA-Ni琼脂糖磁珠镍离子配基密度高, 镍离子脱落程度低, 对带有His标签蛋白的结合具有很强的特异性。本试剂盒的IDA-Ni琼脂糖磁珠每毫升悬浊液含约25%琼脂糖磁珠沉淀, 含有不少于30-50 $\mu\text{mol/ml}$ 的IDA-Ni<sup>2+</sup>, 通常每毫升磁珠(100%磁珠)可结合20-40mg His标签融合蛋白, 具体的最大结合量和标签蛋白的分子量大小等相关。
- **本试剂盒可结合多种形式的His标签蛋白。**本产品可特异性地结合N端His融合蛋白(His-Protein)、C端His融合蛋白(Protein-His)。
- **本试剂盒结合目的蛋白速度快。**本试剂盒使用了IDA螯合的镍离子, 粒径在100 $\mu\text{m}$ 左右, 配合优化的缓冲液, 通常30分钟内即可完成His蛋白吸附的过程, 60分钟内完成目的蛋白纯化或免疫沉淀操作。缩短操作时间可以有效避免在长时间操作过程中目的蛋白的降解或变性, 充分保证目的蛋白的活性。
- **本试剂盒可高效洗脱His标签蛋白。**本试剂盒根据目的蛋白的结构、生物学功能及后续应用的要求等, 使用咪唑(Imidazole)进行多次洗脱。洗脱时间短, 洗脱效率高。本试剂盒中IDA-Ni琼脂糖磁珠及国外同类产品Competitor B用于His标签融合蛋白在非变性条件下的纯化效果参考图2。

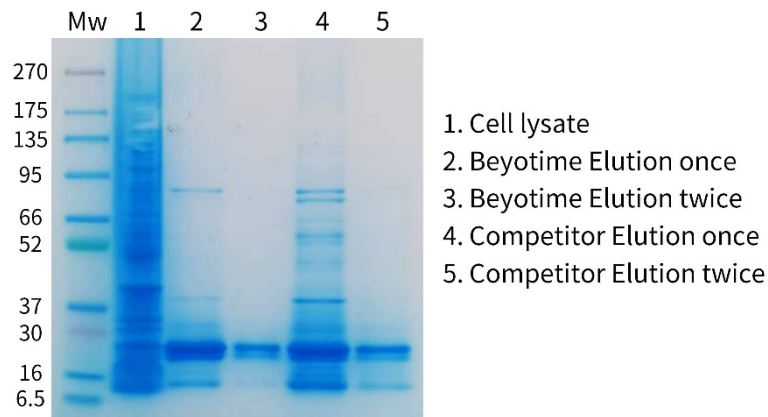


图2. 碧云天His标签蛋白纯化试剂盒(IDA-Ni琼脂糖磁珠)(P2245)在非变性条件下用于His标签融合蛋白的纯化效果图。样品1为细菌裂解液, 即大肠杆菌中His标签融合蛋白全细菌裂解液; 样品2、3分别为His标签蛋白纯化试剂盒(IDA-Ni琼脂糖磁珠)洗脱第一次、第二次的样品; 样品4、5分别为B公司同类产品(Competitor B)洗脱第一次、第二次的样品。图中可见和B公司同类产品相比, 洗脱下来的蛋白样品杂带明显更少(样品2和4相比), 提示本产品的非特异性吸附更低。实际结果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 本图仅供参考。

- 本试剂盒中IDA-Ni琼脂糖磁珠的主要指标如下表:

Characteristics	Description
Product content	25% slurry in specific protective buffer
Beads size	30~150 $\mu\text{m}$
Magnetization	Superparamagnetic
Coupled Ligand	Iminodiacetic acid (IDA)
Chelating metal ion	Ni <sup>2+</sup>
Metal ion density	30-50 $\mu\text{mol/ml}$ beads
Binding capacity	20-40mg His-tagged fusion protein per ml beads (100%)
Specificity	Met-His-tag-Protein, His-tag-Protein, Protein-His-tag
Application	Protein purification, IP, Co-IP

- 本试剂盒中IDA-Ni琼脂糖磁珠每毫升悬浊液中共含约0.25ml琼脂糖磁珠沉淀。IDA-Ni琼脂糖磁珠标注的体积为悬浊液总体积。每毫升悬浊液可以用于纯化5-10mg分子量约为60kD的His标签蛋白。His标签蛋白分子量的大小会影响本产品可以纯化的目的蛋白的毫克数。

- 本试剂盒小包装足够进行10次His标签重组蛋白纯化，每次细菌沉淀的湿重约为1-2克。每次蛋白的最大纯化量为10-15mg，具体的最大纯化量和蛋白分子量有关；对于分子量为60kD的带有His标签重组蛋白，每次的蛋白最大纯化量为5-10mg。

#### 包装清单：

产品编号	产品名称	包装
P2245S-1	IDA-Ni琼脂糖磁珠	10ml
P2245S-2	非变性裂解液	120ml
P2245S-3	非变性洗涤液	250ml
P2245S-4	非变性洗脱液	60ml
P2245S-5	变性裂解液	120ml
P2245S-6	变性洗涤液	120ml
P2245S-7	变性洗脱液	60ml
P2245S-8	溶菌酶	60mg
—	说明书	1份

#### 保存条件：

-20°C保存，两年有效。4°C保存，一年有效。

#### 注意事项：

- 本试剂盒提供的试剂适用于大多数His标签蛋白的纯化。对于特殊样品，需自行进行适当的优化。
- 本试剂盒中的IDA-Ni琼脂糖磁珠经测试，冻融3次不影响效价，但仍建议适当分装减少冻融次数。频繁使用建议4°C保存。
- 本试剂盒中的IDA-Ni琼脂糖磁珠需维持pH为6-8，避免高速离心、干燥；请勿长时间将磁珠置于磁场中，否则可能会引起磁珠聚团。
- 本试剂盒中的IDA-Ni琼脂糖磁珠在使用过程中，缓冲试剂如Tris、HEPES、MOPS等的浓度不宜超过100mM，避免含有EDTA或EGTA等螯合剂，避免含有Glycine和DTT、DTE等还原剂，Triton、Tween、NP-40的浓度不宜超过2%，脱氧胆酸钠、CHAPS的浓度不宜超过1%，组氨酸浓度不宜超过20mM，钙离子浓度不宜超过5mM，盐酸胍浓度可以高达6M，尿素浓度可以高达8M，钠离子和镁离子浓度可以高达2M，甘油浓度可以高达50%。其它未提及试剂的兼容性可以参考上述试剂，但有待实验验证。虽然本IDA-Ni琼脂糖磁珠可以耐受6M盐酸胍或8M尿素，但在高浓度变性剂条件下，载量会有一定的降低。
- 本试剂盒中的IDA-Ni琼脂糖磁珠使用前要适当充分重悬，即颠倒若干次使磁珠混合均匀，混匀操作须轻柔，不宜剧烈涡旋震荡。
- 在纯化或免疫沉淀时，建议设置阳性和阴性对照组。
- 若离心不能完全除去蛋白样品中的不溶物，可以将样品溶液用0.45μm的滤膜过滤。
- 蛋白样品收集后宜尽快完成纯化工作，并应始终放置在4°C或冰浴，以减缓蛋白降解或变性。为有效抑制蛋白降解，可以在蛋白样品中添加适量的蛋白酶抑制剂混合物，例如碧云天的蛋白酶抑制剂混合物(通用型) (P1005/P1006)、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(通用型，质谱兼容，50X) (P1048/P1049)、蛋白酶抑制剂混合物(哺乳动物样品抽提用，100X) (P1010/P1011)、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(哺乳动物样品抽提用，50X) (P1050/P1051)等。
- 若使用本说明书提供的条件无法达到理想的纯化效果，可尝试改变洗涤液和洗脱液中咪唑的浓度和(或)pH，以达到更优效果。
- 如果使用真空泵等仪器吸取上清液，须注意真空泵的吸液强度，以免吸力过大而吸取到聚集的磁珠。
- 0.1%的非离子型去垢剂(如Triton X-100、Tween-20或NP-40)可有效防止磁珠聚集，并且不会影响磁珠的抗体结合效率。
- 如果自行配制裂解液，需注意高浓度的DTT、巯基乙醇等对本产品与标签蛋白的结合可能有一定影响，但Western及IP细胞裂解液(P0013)、RIPA裂解液(P0013B/C/D)或NP-40裂解液(P0013F)等都完全适用。碧云天生产的不同裂解液的主要特点和差异，以及如何选择裂解液可参考我们的相关网页：<http://www.beyotime.com/support/lysis-buffer.htm>。
- 本试剂盒仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

#### 使用说明：

对于用IDA-Ni琼脂糖磁珠纯化大肠杆菌中His标签蛋白比较熟悉的使用者可以直接参考‘7. 简化的操作流程’。否则请参考如下详细内容：

如下以最常见的大肠杆菌中表达纯化His标签重组蛋白为例，说明本产品的使用方法。在其它体系中表达时，请参考该表达体系的相关使用说明，并借鉴大肠杆菌中纯化His标签重组蛋白的使用说明。

##### 1. 大肠杆菌中His标签重组蛋白的诱导表达：

如下以最常用的IPTG诱导表达系统给予说明，诱导表达条件的优化请参照所使用的诱导表达体系的详细说明。其它诱导表达系统请参考适当的使用说明进行。

- 挑取表达His标签重组蛋白的单克隆，接种到3ml或10-20ml含适当抗生素的LB培养液中，培养过夜。
- 按照1:20的比例取培养过夜的菌液，接种到预热至37°C并含适当抗生素的LB培养液中。例如取5ml培养过夜的菌液接种到100ml预热至37°C并含适当抗生素的LB培养液中。具体的培养体积视需要纯化的蛋白量而定，初步的鉴定培养3-10ml即可；常规的表达纯化，通常可考虑培养100-200ml；制备型的纯化，培养体积可以达到1L或更大。如果希望取得更好的表达效果，建议按照1:100的比例接种过夜培养的菌液，但后续培养至相应的OD值需要更长的时间。
- 37°C常规培养约30-60min或更长时间，至菌液的OD<sub>600</sub>达到0.5-0.7，并且OD<sub>600</sub>最好接近0.6。



d. 加入IPTG至终浓度为1mM, 继续培养4-5小时。

注: 可以在加入IPTG前取出少量菌液同样培养4-5小时后作为未诱导的对照, 也可以在加入IPTG前直接取出少量菌液作为未诱导的对照。对于特定蛋白的诱导表达, 最佳的IPTG浓度、诱导温度、和诱导时间需要通过实验确定。

e. 收集菌液至离心管中, 4°C 4,000×g离心20min或4°C 15,000×g离心1min, 弃上清, 收集沉淀。随后即可进入细菌裂解步骤, 也可以在-20°C或-80°C冻存备用。冷冻保存的菌体使用前需置于冰上解冻15min。

## 2. IDA-Ni琼脂糖磁珠的准备:

a. 用移液器轻轻吹打重悬IDA-Ni琼脂糖磁珠, 按照每5-10mg目标蛋白(分子量约为60kD)需要使用1ml磁珠悬浊液的用量, 取适量IDA-Ni琼脂糖磁珠至一洁净离心管中(FTUB015), 磁性分离去除上清; 加入与原磁珠悬浊液等体积的非变性洗涤液洗涤磁珠。

b. 用移液器轻轻吹打重悬IDA-Ni琼脂糖磁珠。置于磁力架(FMS012/FMS024)上分离10秒, 去除上清。重复上述步骤两次。

注: 为了减少磁珠的损耗, 待溶液澄清后, 盖紧离心管盖子, 保持离心管仍在磁力架上, 按住离心管上下翻转数次, 使澄清的溶液洗涤离心管盖子上残留的磁珠, 静置后使溶液变澄清。以下所有的磁性分离都可以参考执行。

c. 根据后续纯化时采用非变性还是变性条件, 分别选择加入与原磁珠悬浊液等体积的非变性洗涤液或变性洗涤液重悬琼脂糖磁珠, 备用。

## 3. 非变性条件下His标签蛋白的小量纯化:

本方法常用于小量样品的快速分析和鉴定, 为后续大量制备打下基础。

a. 接步骤1(e), 离心收集1ml菌液的细菌沉淀并弃上清, 加入100μl非变性裂解液, 将细菌沉淀充分重悬于裂解液中, 可进行轻微的vortex(尽量避免产生气泡)。

注: 根据His标签重组蛋白表达的丰度, 菌液和裂解液的体积比可以在25:1-5:1范围内适当调整。表达丰度非常高时, 每毫升菌液沉淀可以加入200μl裂解液; 表达丰度非常低时, 每毫升菌液沉淀可以加入40μl裂解液。相关溶液的配制方法附后。本非变性裂解液可以确保裂解绝大多数可溶性蛋白和包涵体蛋白, 裂解后可以直接用于SDS-PAGE。如有必要, 可以在裂解细菌之前, 在裂解液中添加适量的蛋白酶抑制剂混合物, 例如碧云天的P1030/P1031 蛋白酶抑制剂混合物(His-Tag蛋白纯化用, 100X)。加入的蛋白酶抑制剂混合物不能对IDA-Ni琼脂糖磁珠的性能有影响。如果自行配制相关缓冲液, 不能含有EDTA、EGTA等螯合剂, DTT、巯基乙醇等还原剂。

b. 加入溶菌酶至1mg/ml并轻轻混匀, 尽量避免产生气泡, 冰水浴或冰上放置30min。

注: 溶菌酶可以用裂解液配制成100mg/ml的母液, 临使用前加入。溶菌酶配制成母液后, 可以适当分装后-20°C保存。

c. 轻轻vortex数下, 以充分裂解细菌, 尽量避免产生气泡。

d. 4°C离心(15000×g, 10min), 取10μl上清留样作后续检测用, 收集余下上清至一新的洁净离心管中。

e. 加入磁珠与孵育。加入20μl步骤2中混合均匀的IDA-Ni琼脂糖磁珠悬浊液, 置于侧摆摇床或旋转混合仪上, 室温孵育20-30min。

注: 如果需要, 可以在2-8°C旋转混合1小时, 以防止目标蛋白降解。推荐使用BeyoShaker™数字式翘板摇床(E6673)。

f. 磁分离。孵育完毕后, 置于磁力架上分离10秒, 去除上清。注: 可保留部分上清液, 用于检测目的蛋白的结合效果。

g. 洗涤。加入100μl非变性洗涤液, 用移液器轻轻吹打重悬IDA-Ni琼脂糖磁珠。置于磁力架上分离10秒, 取20μl上清留样作后续检测用, 其余上清弃去。共重复洗涤三次。

h. 洗脱。加入20μl非变性洗脱液, 轻轻翻转离心管数次, 使磁珠悬浮孵育5min, 磁性分离, 收集洗脱液到新的离心管, 即为纯化获得的His标签蛋白。如果有必要, 可以重复洗脱步骤一次, 收集样品到新的离心管中, 还可以得到一些His标签蛋白。

## 4. 非变性条件下His标签蛋白的大量纯化:

a. 接步骤1(e), 对于新鲜的或解冻的细菌沉淀, 按照每克细菌沉淀湿重加入4ml (2-5ml均可)非变性裂解液的比例加入裂解液, 充分重悬菌体。如有必要, 可以在裂解细菌之前, 在裂解液中添加适量的蛋白酶抑制剂混合物, 例如碧云天的P1030/P1031 蛋白酶抑制剂混合物(His-Tag蛋白纯化用, 100X)。注: 后续试剂用量均按照1克菌重和4ml裂解液用量进行。

b. 加入溶菌酶至终浓度为1mg/ml并混匀, 冰水浴或冰上放置30min。

注: 溶菌酶可以用裂解液配制成100mg/ml的母液, 临使用前加入。溶菌酶配制成母液后, 可以适当分装后-20°C保存。

c. 冰上超声裂解细菌。超声功率200-300W, 每次超声处理10s, 每次间隔10s, 共超声处理6次。

注: 具体超声处理的方式须根据特定型号的超声仪器自行摸索和优化。

d. (可选做)如果超声处理后裂解液非常粘稠, 可以加入适量核酸酶, 如RNase A至10μg/ml及DNase I至5μg/ml, 或BeyoZonase™超级核酸酶(≥99%) (D7121), 冰上放置10-30min, 以降解核酸。或者也可以使用适当的装好了较细针头的注射器, 反复抽取数次, 以剪切粘稠的基因组DNA等。

e. 4°C 10,000×g离心20-30min, 收集细菌裂解液上清并置于冰水浴或冰上。可以取20μl上清留作后续检测用。

注: 上清必须保持澄清, 即不含任何不溶物, 才能进行下一步的纯化。上清中如果混有不溶性杂质会严重影响后续纯化获得蛋白的纯度。

f. 加入磁珠与孵育。加入1ml步骤2中混合均匀的IDA-Ni琼脂糖磁珠, 置于侧摆摇床或旋转混合仪上, 室温孵育20-30分钟。注: 如果需要, 可以在2-8°C旋转混合1小时, 以防止目标蛋白降解。推荐使用BeyoShaker™数字式翘板摇床(E6673)。

g. 磁分离。孵育完毕后, 置于磁力架上分离10秒, 去除上清。注: 可保留部分上清液, 用于检测目的蛋白的结合效果。

h. 洗涤。洗涤磁珠5次, 每次加入0.5-1ml非变性洗涤液, 每次均收集约20μl穿柱的洗涤液用于后续的分析检测用。洗涤及下一步洗脱过程中可以用Bradford法(P0006或P0006C)简单快速地检测每次洗涤液和洗脱液中的蛋白含量, 从而考虑增加或减少洗涤和洗脱的次数。

注: 如果出现后续获得蛋白纯度不够高的情况, 可以再增加洗涤次数2-3次。

i. 洗脱。洗脱目的蛋白6-10次, 每次用0.5ml非变性洗脱液洗脱。将每次的洗脱液分别收集到不同的离心管中。收集获得的洗脱

液即为纯化的His标签蛋白样品。

#### 5. 变性条件下His标签蛋白的小量纯化:

本方法常用于小量样品的快速分析和鉴定,为后续大量制备打下基础。

a. 按步骤1(e),离心收集1ml菌液的细菌沉淀并弃上清,加入100 $\mu$ l变性裂解液,将细菌沉淀充分重悬于裂解液中,可进行轻微的vortex(尽量避免产生气泡)。

注:根据His标签重组蛋白表达的丰度,菌液和裂解液的体积比可以在25:1-5:1范围内适当调整。表达丰度非常高时,每毫升菌液沉淀可以加入200 $\mu$ l裂解液;表达丰度非常低时,每毫升菌液沉淀可以加入40 $\mu$ l裂解液。相关溶液的配制方法附后。本变性裂解液可以确保裂解绝大多数可溶性蛋白和包涵体蛋白,含尿素裂解液裂解后可以直接用于SDS-PAGE,含盐酸胍的裂解液裂解后需透析除去盐酸胍才可用于SDS-PAGE。

b. 冰上超声裂解细菌。超声功率200-300W,每次超声处理10s,每次间隔10s,共超声处理6次。具体超声处理的方式须根据特定型号的超声仪器自行摸索和优化。

c. 4 $^{\circ}$ C离心(15000 $\times$ g, 10min),取10 $\mu$ l上清留样作后续检测用,收集余下上清至一新的洁净离心管中。

d. **加入磁珠与孵育。**加入20 $\mu$ l步骤2中混合均匀的IDA-Ni琼脂糖磁珠,置于侧摆摇床或旋转混合仪上,室温孵育20-30分钟。注:如果需要,可以在2-8 $^{\circ}$ C旋转混合1小时,以防止目标蛋白降解。推荐使用BeyoShaker<sup>TM</sup>数字式翘板摇床(E6673)。

e. **磁分离。**孵育完毕后,置于磁力架上分离10秒,去除上清。注:可保留部分上清液,用于检测目的蛋白的结合效果。

f. **洗涤。**加入100 $\mu$ l变性洗涤液重悬磁珠,置于磁力架上分离10秒,取20 $\mu$ l上清留样作后续检测用,其余上清弃去。

g. **重复洗涤。**加入100 $\mu$ l变性洗涤液重悬磁珠,置于磁力架上分离10秒,取20 $\mu$ l上清留样作后续检测用,其余上清弃去。

h. **洗脱。**加入20 $\mu$ l变性洗脱液,轻轻翻转离心管数次,使磁珠悬浮孵育5min,磁性分离,收集洗脱液到新的离心管,即为纯化获得的His标签蛋白。如果有必要,可以重复洗脱步骤一次,收集样品到新的离心管中,还可以得到一些His标签蛋白。

#### 6. 变性条件下His标签蛋白的大量纯化:

按步骤1(e),对于新鲜的或解冻的细菌沉淀,按照每1L表达菌加入80ml变性裂解液的比例加入裂解液,充分重悬菌体。

a. 冰上超声裂解细菌。超声功率200-300W,每次超声处理2s,每次间隔2s,共超声处理15-30min。

注:具体超声处理的方式须根据特定型号的超声仪器自行摸索和优化。

b. (可选做)如果超声处理后裂解液非常粘稠,可以使用适当的装好了较细针头的注射器,反复抽吸数次,以剪切粘稠的基因组DNA等。

c. 4 $^{\circ}$ C 10,000 $\times$ g离心20-30min,收集细菌裂解液上清并置于冰水浴或冰上。可以取20 $\mu$ l上清留作后续检测用。

注:上清必须保持澄清,即不含任何不溶物,才能进行下一步的纯化。上清中如果混有不溶性杂质会严重影响后续纯化获得蛋白的纯度。

d. **加入磁珠与孵育。**按照每0.25ml实体积琼脂糖磁珠凝胶(相当于1ml步骤2中混合均匀的IDA-Ni琼脂糖磁珠悬浊液)中加入4ml细菌裂解液上清的比例(1:16),混合步骤2中混合均匀的IDA-Ni琼脂糖磁珠和细菌裂解液上清,置于侧摆摇床或旋转混合仪上,室温孵育20-30分钟。注:如果需要,可以在2-8 $^{\circ}$ C旋转混合1小时,以防止目标蛋白降解。推荐使用BeyoShaker<sup>TM</sup>数字式翘板摇床(E6673)。

e. **磁分离。**孵育完毕后,置于磁力架上分离10秒,去除上清。注:可保留部分上清液,用于检测纯化的效果。

f. **洗涤。**洗涤磁珠5次,每次加入0.5-1ml变性裂解液,每次均收集约20 $\mu$ l洗涤液用于后续的分析检测用。洗涤及下一步洗脱过程中可以用Bradford法(P0006或P0006C)简单快速地检测每次洗涤液和洗脱液中的蛋白含量,从而考虑增加或减少洗涤和洗脱的次数。

注:如果出现后续获得蛋白纯度不够高的情况,可以再增加洗涤次数2-3次。

g. **重复洗涤。**再次洗涤磁珠5次,每次加入0.5-1ml变性洗涤液,每次均收集约20 $\mu$ l穿柱的洗涤液用于后续的分析检测用。

注:如果出现后续获得蛋白纯度不够高的情况,可以再增加洗涤次数2-3次。

h. **洗脱。**洗脱目的蛋白5-10次,每次用0.5ml变性洗脱液。将每次的洗脱液分别收集到不同的离心管中。收集获得的洗脱液即为纯化获得的His标签蛋白样品。

#### 7. 简化的操作流程:

a. 细菌中的目的蛋白诱导表达后,离心沉淀细菌。根据待纯化蛋白的溶解性,选择非变性或变性条件进行纯化。

b. 每克细菌沉淀湿重加入4ml裂解液,可添加适量蛋白酶抑制剂,充分重悬细菌。

c. 冰上超声裂解细菌,离心取上清。非变性条件下可以先使用溶菌酶处理,然后再进行超声处理。

d. 用与原磁珠悬浊液等体积的非变性洗涤液平衡IDA-Ni琼脂糖磁珠2次。

e. 按照每4ml裂解液使用1ml磁珠悬浊液的比例,取步骤7c中的上清与IDA-Ni琼脂糖磁珠结合。

f. 非变性条件下,用0.5-1ml洗涤液洗涤磁珠5次。变性条件下需要先使用0.5-1ml裂解液洗涤5次,然后再使用0.5-1ml洗涤液洗涤磁珠5次。

注:如果出现咪唑浓度偏低的情况,可以自行添加适量咪唑,如果出现咪唑浓度偏高的情况,可以使用试剂盒提供的裂解液作为洗涤液使用。

g. 用0.5ml洗脱液洗脱6-10次。

注:通常该洗脱条件会比较理想。如果出现洗脱效果欠佳的情况,可以自行在洗脱液中额外加入250mM的咪唑。

#### 常见问题:

如果纯化不成功,可以对纯化过程中收集的每个组分进行SDS-PAGE电泳检测,分析其原因。

#### 1. 蛋白无法与IDA-Ni琼脂糖磁珠结合

- a. 测序检查基因序列的读码框是否正确。
  - b. 尝试将标签加在蛋白的另一端。
  - c. 增加IDA-Ni琼脂糖磁珠与蛋白结合时间(如4°C过夜)。
  - d. 检查所有缓冲液和溶液的pH值是否正确。
  - e. 确认体系中所用各种试剂的浓度在IDA-Ni琼脂糖磁珠的耐受范围以内。
  - f. 自行配制裂解液, 降低裂解液中的咪唑浓度。
2. **目的蛋白被洗涤液洗脱**
    - a. 自行配制洗涤液, 降低洗涤液中的咪唑浓度或者稍微提高其pH值。
    - b. 检查洗涤液的pH和成分。
    - c. 确认洗涤液中各种试剂的浓度在耐受范围内。
  3. **蛋白在纯化过程中形成沉淀**
    - a. 将纯化温度控制在室温。
    - b. 加入去垢剂, 如0.1% Triton X-100或者Tween-20。
  4. **蛋白无法洗脱**
    - a. 用梯度pH及咪唑洗脱, 确定最优洗脱条件。
  5. **目的蛋白与其它蛋白共同洗脱**
    - a. 提高裂解液和洗涤液中的咪唑浓度。
    - b. 降低IDA-Ni琼脂糖磁珠的使用量。
    - c. 增加盐或者去垢剂浓度, 或者向洗涤液中加入乙醇或甘油以降低非特异相互作用。
    - d. 检查基因内部是否含有起始密码子(C端标记蛋白)或者提前终止位点(N端标记蛋白)。

#### 参考文献:

1. Bromberg R, Cai K, Guo Y, Plymire D, Emde T, et al. Front Mol Biosci. 2022. 9:912072.
2. Zeng K, Sun EJ, Liu ZW, Guo J, Yuan C, et al. RSC Adv. 2020. 10(19):11524-11534.

#### 相关产品:

产品编号	产品名称	包装
FMS012	BeyoMag™磁分离架(12孔)	1个/袋
FMS024	BeyoMag™磁分离架(24孔)	1个/袋
FMS096	BeyoMag™磁分离架(96孔)	1个/袋
FMS004	BeyoMag™磁分离架(4孔, 1.5ml/2ml, 蓝)	1个/盒
FMS008	BeyoMag™磁分离架(8孔, 1.5ml/2ml, 蓝)	1个/盒
FMS016	BeyoMag™磁分离架(16孔, 1.5ml/2ml, 蓝)	1个/盒
FMS154	BeyoMag™磁分离架(4孔, 15ml, 蓝)	1个/盒
FMS504	BeyoMag™磁分离架(4孔, 50ml, 蓝)	1个/盒
FMS009	BeyoMag™磁分离架(8孔, 1.5ml/2ml, 铝合金)	1个/盒
FMS015	BeyoMag™磁分离架(16孔, 1.5ml/2ml, 铝合金)	1个/盒
FMS025	BeyoMag™磁分离架(24孔, 1.5ml/2ml, 铝合金)	1个/盒
P2210	BeyoGold™ His-tag Purification Resin (耐还原螯合型)	10ml
P2218	BeyoGold™ His-tag Purification Resin (耐还原螯合型)	100ml
P2220	BeyoGold™ His-tag Purification Resin (耐还原螯合型)	1000ml
P2221-10ml	BeyoGold™ His-tag Purification Resin (Fast Flow, 耐还原螯合型)	10ml
P2221-100ml	BeyoGold™ His-tag Purification Resin (Fast Flow, 耐还原螯合型)	100ml
P2221-1000ml	BeyoGold™ His-tag Purification Resin (Fast Flow, 耐还原螯合型)	1000ml
P2135-0.5ml	BeyoMag™ Anti-His Magnetic Beads (Anti-His磁珠)	0.5ml
P2135-2ml	BeyoMag™ Anti-His Magnetic Beads (Anti-His磁珠)	2ml
P2226	His标签蛋白纯化试剂盒(耐还原螯合型)	10ml
P2229S	His标签蛋白纯化试剂盒(耐变性剂型)	10ml
P2233-10ml	BeyoGold™ His-tag Purification Resin (耐变性剂型)	10ml
P2233-100ml	BeyoGold™ His-tag Purification Resin (耐变性剂型)	100ml
P2233-1000ml	BeyoGold™ His-tag Purification Resin (耐变性剂型)	1000ml
P2236-10ml	BeyoGold™ His-tag Purification Resin (Fast Flow, 耐变性剂型)	10ml
P2236-100ml	BeyoGold™ His-tag Purification Resin (Fast Flow, 耐变性剂型)	100ml
P2236-1000ml	BeyoGold™ His-tag Purification Resin (Fast Flow, 耐变性剂型)	1000ml
P2239-2ml	BeyoMag™ His标签蛋白纯化琼脂糖磁珠(IDA-Ni)	2ml

P2239-10ml	BeyoMag™ His标签蛋白纯化琼脂糖磁珠(IDA-Ni)	10ml
P2239-50ml	BeyoMag™ His标签蛋白纯化琼脂糖磁珠(IDA-Ni)	50ml
P2241-2ml	BeyoMag™ His标签蛋白纯化琼脂糖磁珠(NTA-Ni)	2ml
P2241-10ml	BeyoMag™ His标签蛋白纯化琼脂糖磁珠(NTA-Ni)	10ml
P2241-50ml	BeyoMag™ His标签蛋白纯化琼脂糖磁珠(NTA-Ni)	50ml
P2243-2ml	BeyoMag™ His标签蛋白纯化琼脂糖磁珠(TED-Ni)	2ml
P2243-10ml	BeyoMag™ His标签蛋白纯化琼脂糖磁珠(TED-Ni)	10ml
P2243-50ml	BeyoMag™ His标签蛋白纯化琼脂糖磁珠(TED-Ni)	50ml
P2245S	His标签蛋白纯化试剂盒(IDA-Ni琼脂糖磁珠)	10ml
P2247S	His标签蛋白纯化试剂盒(NTA-Ni琼脂糖磁珠)	10ml
P2249S	His标签蛋白纯化试剂盒(TED-Ni琼脂糖磁珠)	10ml

Version 2023.07.24