

# 使用说明书

Instruction Manual

TargetMol  
YOUR TARGET MOLECULES

## His-tag 蛋白纯化磁珠 NTA-Ni Magrose Beads NTA-Nickel (Ultra-suspension)

### 产品描述

TargetMol 的 His-tag 蛋白纯化磁珠是一种超顺磁性的新型功能材料，用于高效、快速地纯化组氨酸标签蛋白。His-tag 蛋白纯化磁珠通过磁性分离技术，能够一步从生物样品中直接提取出高纯度的目标蛋白，大大简化了纯化流程并提高了效率，适用于科研和工业领域的便捷蛋白纯化。

His-tag 蛋白纯化磁珠系列以磁性琼脂糖微球为基质，活化偶联亚氨基二乙酸 (IDA) 或氨三乙酸 (NTA)，分别螯合镍离子 (Nickel) 和钴离子 (Cobalt) 两种金属离子。IDA 和 NTA 分别拥有 3 和 4 个配位位点与镍离子结合，这样镍离子空余的能与 His 标签结合的位点为 3 和 2 个，所以 IDA 与 His 标签蛋白结合力相对较强，载量较高，但特异性较弱，而 NTA 则相反。镍离子和钴离子在目标蛋白结合量和非特异性吸附等方面有所不同，镍离子磁珠的蛋白载量高，但纯度稍低 (90%)，钴离子的蛋白载量稍低，但纯度更高 (95%)。用户可以根据目标蛋白与不同金属的结合特性，以及对目标蛋白产量和纯度的需求，选择不同种类的 His-tag 蛋白纯化磁珠。

### 产品特点

- 粗样品无需预处理，可直接纯化目标蛋白，显著缩短纯化时间。
- 一步纯化即可获得高产率、高纯度的目标蛋白。
- 可自由调节目标蛋白的浓度和体积。
- 平行操作稳定性高，便于进行高通量和大规模蛋白纯化。
- 磁珠可重复使用，再生操作简单。

### 不同 His-tag 蛋白纯化磁珠的比较

产品名称	IDA-Ni (C0109)	IDA-Co (C0110)	NTA-Ni (C0111)
材质	琼脂糖		
磁珠粒径范围	30-150 $\mu\text{m}$	30-150 $\mu\text{m}$	10-30 $\mu\text{m}$
螯合金属离子	$\text{Ni}^{2+}$	$\text{Co}^{2+}$	$\text{Ni}^{2+}$
金属离子密度	30-50 $\mu\text{mol/mL}$ (100%磁珠)		
蛋白结合量	30-40 $\text{mg/mL}$ (100%磁珠)	20-30 $\text{mg/mL}$ (100%磁珠)	40-50 $\text{mg/mL}$ (100%磁珠)
耐受 pH	3-11		
工作温度	2-30 $^{\circ}\text{C}$		
悬液浓度	10% (v/v) 磁珠悬液		25% (v/v) 磁珠悬液
保存溶剂	20% (v/v) Ethanol		

### 产品应用

- 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 His 标签蛋白。
- 纯化变性蛋白；包涵体需变性后再进行纯化。

## 操作说明

### 1. 缓冲液准备

以下为常用的缓冲液成分，适用于多数 His 标签蛋白的纯化，使用时可根据需要进行调整。缓冲液在使用前最好使用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤除菌。

- 1) Binding Buffer: 20 mM Phosphate Buffer, 500 mM NaCl, 5~50 mM Imidazole, pH7.4.
- 2) Washing Buffer: 20 mM Phosphate Buffer, 500 mM NaCl, 50~100 mM Imidazole, pH7.4.
- 3) Elution Buffer: 20 mM Phosphate Buffer, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazole, pH7.4.

### 2. 蛋白样品处理

- 1) 大肠杆菌、酵母等细胞内表达蛋白: 用适量 Binding Buffer 稀释表达细胞, 加入蛋白酶抑制剂 (如 1 mM PMSF 或蛋白酶抑制剂 Cocktail C0001), 重悬细胞后冰浴超声裂解细胞, 即得到粗蛋白样品。如果样品过于粘稠, 可根据需要在粗样品中加入适量核酸酶, 冰浴 30 min, 以降解核酸。也可以根据实际需要可对蛋白样品进行离心操作。
- 2) 动物细胞胞内表达蛋白: 取适量动物细胞, 用适量 PBS 洗涤 1 次, 吸去上清液, 再用适量含 1% (v/v) Triton X-100 或 1% (v/v) NP-40 的 Binding Buffer 重悬, 加入蛋白酶抑制剂, 冰浴 10 min, 即得到粗蛋白样品。
- 3) 胞外表达蛋白: 取胞外表达的上清液, 用等量的 Binding Buffer 稀释, 即得到粗蛋白样品。

### 3. 磁珠预处理

磁珠使用量需要根据目标蛋白产量和磁珠载量信息计算。例如, 使用大肠杆菌表达某目标蛋白, 500 mL 的发酵液可收获 2 g 湿重的菌体, 通过预实验估算其目标蛋白产量为 10~20 mg, 则需要取 5 mL 磁珠悬液用于目标蛋白的纯化。以此为例介绍操作步骤:

- 1) 将 His-tag 蛋白纯化磁珠用涡旋振荡器振荡充分混匀, 然后使用移液器吸取 5 mL 磁珠悬液置于 15 mL 离心管中。将离心管放入磁性分离器, 静置 1 min, 进行磁性分离, 吸去上清液, 取下离心管。
- 2) 向离心管中加入 5 mL Binding Buffer, 温和翻转离心管数次, 使磁珠重新悬浮。接着进行磁性分离, 吸去上清液。重复洗涤步骤 2 次。

### 4. 磁珠与目标蛋白结合

- 1) 使用 10 mL Binding Buffer 悬浮 2 g 湿重的菌体, 进行破碎和裂解后得到目标粗蛋白样品。将其加入装有预处理磁珠的离心管中, 并将离心管放置于涡旋混合器中振荡 15 s。
- 2) 将离心管置于旋转混合仪上, 室温下旋转混合 20~30 min; 或者为了防止目标蛋白降解, 也可在 2~8°C 的低温环境下旋转混合 1 h。
- 3) 将离心管进行磁性分离, 将上清液移至新的离心管中备用后续检测。取下离心管, 进行后续的洗涤步骤。

### 5. 磁珠洗涤

- 1) 向装有磁珠的离心管中加入 10 mL Washing Buffer, 温和翻转离心管数次, 使磁珠重新悬浮, 进行磁性分离。将清洗液移至新的离心管中备用, 以备取样检测。重复洗涤步骤 1 次。
- 2) 为避免原离心管壁上的非特异性吸附蛋白污染目标蛋白, 向装有磁珠的离心管中加入 10 mL Washing Buffer, 使磁珠重新悬浮后, 将磁珠悬液转移至新的离心管中, 进行磁性分离, 将上清液移至清洗液收集管中。

### 6. 目标蛋白洗脱

- 1) 根据需要确定洗脱体积以调整目标蛋白浓度, 加入 2~10 mL Elution Buffer, 温和翻转离心管数次, 使磁珠重新悬浮, 进行磁性分离。将洗脱液收集到新的离心管中, 即得到纯化的目标蛋白样品。
- 2) 为确保目标蛋白完全洗脱, 可重复上述步骤 1 次。

### 7. 磁珠后处理

- 1) 向装有磁珠的离心管中加入 5 mL Elution Buffer, 温和翻转离心管数次, 使磁珠重新悬浮, 进行磁性分离, 吸去上清液。重复此步骤 2 次。
- 2) 向离心管中加入 5 mL ddH<sub>2</sub>O, 温和翻转离心管数次, 使磁珠重新悬浮, 进行磁性分离, 吸去上清液。重复此步骤 2 次。
- 3) 向磁珠加入 Storage Buffer, 使总体积为 5 mL, 保存于 2~30°C (长期保存时, 置于 2~8°C), 可用于下一次同种蛋白的纯化。

### 8. 磁珠再生

磁珠连续使用超过三次, 其结合目标蛋白的能力可能会显著下降, 因此建议进行磁珠再生处理。以 5 mL 10% (v/v) 磁珠悬液为例, 介绍磁珠再生操作步骤:

- 1) 自备试剂:
  - Stripping Buffer: 20 mM Sodium Phosphate, 500 mM NaCl, 100 mM EDTA, pH 7.4
  - Beads Washing Buffer (可选): 0.5 M NaOH, 2 M NaCl
  - Recharge Buffer: 100 mM NiSO<sub>4</sub> / CoCl<sub>2</sub> (有毒性, 请注意防护)
  - Storage Buffer: 20% (v/v) Ethanol

- 2) 对磁珠悬液进行磁性分离，吸去上清液，取下离心管，加入 5 mL ddH<sub>2</sub>O，温和翻转离心管数次，使磁珠重新悬浮，进行磁性分离，吸去上清液。
- 3) 加入 5 mL Stripping Buffer，温和翻转离心管数次，使磁珠重新悬浮，室温下旋转混合 5 min，进行磁性分离，吸去上清液。重复此步骤 1 次。
- 4) 加入 5 mL ddH<sub>2</sub>O，温和翻转离心管数次，使磁珠重新悬浮，进行磁性分离，吸去上清液。重复此步骤 2 次。
- 5) 碱处理：加入 5 mL Beads Washing Buffer，温和翻转离心管数次，使磁珠重新悬浮，室温下旋转混合 5 min，进行磁性分离，吸去上清液。
- 6) 加入 5 mL ddH<sub>2</sub>O，温和翻转离心管数次，使磁珠重新悬浮，进行磁性分离，吸去上清液。重复此步骤 3~5 次，直到洗涤液呈中性。
- 7) 加入 5 mL Recharge Buffer，温和翻转离心管数次，使磁珠重新悬浮，室温下旋转混合 5 min，进行磁性分离，吸去上清液。
- 8) 加入 5 mL ddH<sub>2</sub>O，温和翻转离心管数次，使磁珠重新悬浮，进行磁性分离，吸去上清液。重复此步骤 4 次以上，以确保完全去除镍离子。
- 9) 最后，加入储存缓冲液至磁珠，总体积为 5 mL，保存于 2~30°C（长期保存时，置于 2~8°C）。

## 9. 蛋白纯化流程的优化

上述操作流程适用于大多数 His 标签蛋白的纯化。根据目标蛋白与金属离子螯合磁珠的结合特性不同，用户对纯化流程进行优化，以提高目标蛋白的回收率和纯度。

- 1) 提高目标蛋白回收率的参考方法：
  - 降低样品溶液和 Binding Buffer 中的 Imidazole 浓度。
  - 在样品溶液和其他缓冲液中添加表面活性剂等物质。
  - 添加适当的蛋白酶抑制剂，防止目标蛋白降解。
  - 增加磁珠的用量。
  - 延长蛋白与磁珠孵育的时间。
  - 延长目标蛋白洗脱的时间或增加洗脱次数。
- 2) 提高目标蛋白纯度的参考方法：
  - 提高样品溶液和 Binding Buffer 中的 Imidazole 和 NaCl 浓度。
  - 在样品溶液和其他缓冲液中添加表面活性剂等物质。
  - 添加适当的蛋白酶抑制剂，防止目标蛋白降解。
  - 延长洗涤时间，增加洗涤次数。
  - 采用梯度 Imidazole 浓度洗脱目标蛋白。

## 保存条件

4°C, 2 年。

## 注意事项

1. 避免对磁珠进行冷冻、干燥和高速离心等操作。
2. 为了减少磁珠的损失，每次磁性分离的时间不应少于 1 min。
3. 从磁珠保存管中取出磁珠之前，应充分震荡以确保均匀悬浮。操作过程中注意避免产生气泡。
4. 建议使用质量较好的移液器吸头和反应管，以避免因磁珠和溶液附着而造成损失。
5. 磁珠与溶液混合过程中，如果溶液粘稠导致翻转离心管无法重悬磁珠，可以使用移液器吹打或瞬时漩涡混合，使磁珠充分重悬。
6. 用户可以根据实际需求保留经磁性分离后移去的上清液，并进行取样检测，以便分析纯化过程并优化蛋白纯化流程。
7. 本产品可以重复使用，当纯化性能降低时，建议进行再生处理。
8. 使用过的磁珠在重复使用时，建议继续纯化同种蛋白；如果要纯化不同种类的蛋白，建议使用新的磁珠。
9. 本产品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。
10. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 附：磁珠的溶剂耐受性

溶剂种类	溶剂名称	可耐受浓度	备注
还原剂	DTE	5 mM	在使用还原剂之前，请先用无还原剂溶液洗涤磁珠。应避免长时间使用还原剂的溶液处理磁珠
	DTT	5 mM	
	β-mercaptoethanol	20 mM	
	TCEP	5 mM	
	Reduced Glutathione	10 mM	
变性剂	Urea	8 M	
	Guanidine Hydrochloride	6 M	
表面活性剂	Triton X-100	2%	
	Tween 20	2%	
	NP-40	2%	
	Cholate	2%	
	CHAPS	1%	
缓冲溶液	Sodium Phosphate, pH 7.4	50 mM	
	HEPES	100 mM	
	Tris-HCl, pH 7.4	100 mM	
	Tris-Acetate, pH 7.4	100 mM	
	MOPS, pH 7.4	100 mM	
	Sodium Acetate, pH 4.0	100 mM	
其他溶液	Imidazole	1.0 M	
	Ethanol	20%	
	NaCl	1.5 M	
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100 mM	
	Glycerin	50%	
	EDTA	1 mM	限于蛋白样品中添加，不可用于缓冲液
	Citrate	60 mM	

