His-tag Protein Purification Kit (IDA-Ni)

His-tag 蛋白纯化试剂盒（IDA-Ni）

产品编号	产品名称	规格
BL2752A	His-tag蛋白纯化试剂盒（IDA-Ni）	10T (5 mL)

产品简介：

His-tag 蛋白纯化试剂盒（IDA-Ni）是以镍离子螯合磁珠为主要成份，还包含磁珠使用过程中所需的主要缓冲液和试剂组分。按照本说明书的操作流程，部分浓缩型缓冲液经过简单稀释、溶解，即可直接用于磁珠法组氨酸标签蛋白纯化和磁珠再生等操作，为用户解决繁杂、费时费力的缓冲液配制问题，轻松实现快速小量蛋白纯化及高通量纯化筛选。

镍离子螯合磁珠具有超顺磁性，是专为高效、快速纯化组氨酸标签蛋白而设计的一种新型功能化材料，用于组氨酸标签蛋白纯化操作时，无需对粗蛋白样品进行高速离心，也不需要过滤操作；无需控制流速，更不需要昂贵的层析设备，通过磁性分离快速实现固－液、液－液分离，操作过程简单。适用于纯化细菌、酵母、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。

产品组分：

组分	产品名称	成分	规格
1	IDA-Ni 镍离子螯合磁珠	10%(V/V)磁珠悬液 (20%乙醇溶液保存)	5 ml
2	10×Phosphate Buffer (For Binding Buffer/Washing Buffer preparation)	200mM Sodium Phosphate, pH7.4	50 ml
3	10×Imidazole Buffer (For Washing/Elution Buffer preparation)	200mM Sodium Phosphate，5M Imidazole, pH7.4	50 ml
4	NaCl	1.46g/支	20 支
5	Stripping Buffer	50mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 100mM EDTA, pH7.4	30 ml
6	Beads Washing Buffer	0.5M NaOH, 2M NaCl	15 ml
7	Recharge Buffer	100mM $NiSO_4$	15 ml

使用方法（仅供参考）：

一般情况下，磁珠的使用量是由用户根据目标蛋白产量和磁珠载量信息计算获得，例如通过预实验估算其目标蛋白产量为 10～20mg，IDA-Ni 与目标蛋白结合量为 3~4 mg/mL，用户需要取 5mL 磁珠悬液用于目标蛋白的纯化。缓冲液的使用量根据磁珠使用量进行相应调整。

一、缓冲液的准备：

目标蛋白与组氨酸标签蛋白纯化磁珠的结合性能将直接影响目标蛋白的纯化效率，而各种缓冲液配制也将在一定程度上影响目标蛋白的回收率和纯度。因此，在较大规模蛋白纯化之前，操作者应该自行设计实验，筛选出适合纯化目标蛋白的缓冲液体系，主要包括 Binding Buffer、Washing Buffer、Elution Buffer。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.
注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。

1、1×Phosphate Buffer 和 1×Imidazole Buffer 的配制：

名称	成分	配制方法	体积
1×Phosphate Buffer	20mM Sodium Phosphate, 500mM NaCl, pH7.4	5mL 10×Phosphate Buffer+ 1 支 NaCl +40mL ddH_2O, 溶解后定容至 50mL	50 ml
1×Imidazole Buffe	20mM Sodium Phosphate, 500mM NaCl, 500mM Imidazole, pH7.4	5mL 10×Imidazole Buffer+ 1 支 NaCl +40mL ddH_2O, 溶解后定容至 50mL	50 ml

2、用户可以根据实际用量按下表配制含不同浓度 Imidazole 的 Binding Buffer 和 Washing Buffer，1×Imidazole Buffer 可作为 Elution Buffer 直接使用。

Imidazole 终浓度(mM)	1×Phosphate Buffer(mL)	1×Imidazole Buffer(mL)	缓冲液体积(mL)
5	49.5	0.5	50
10	49	1	50
20	48	2	50
40	46	4	50
80	42	8	50
100	40	10	50
200	30	20	50

二、样品处理方法：

1、大肠杆菌、酵母等细胞内表达蛋白：按每克细胞加入 5~10mL Binding Buffer，加入蛋白酶抑制剂(如终浓度为 1mM 的 PMSF)，重悬细胞，冰浴超声裂解细胞，即为粗蛋白样品。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，在冰上放置 30min，以降解核酸。另外，用户也可以根据实际需要对蛋白样品进行离心操作。

2、胞外表达蛋白：取胞外表达上清，用等量 Binding Buffer 稀释，即为粗蛋白样品。

3、动物细胞胞内表达蛋白：取适量动物细胞，先用适量 PBS 洗涤 1 次，弃上清；接着用适量含 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（如终浓度为 1 mM 的 PMSF），冰浴 10 min，即为粗蛋白样品。

三、磁珠预处理：

一般情况下，磁珠的使用量是由操作者根据目标蛋白产量和磁珠载量信息计算获得。例如：采用大肠杆菌表达某目标蛋白，500 mL 发酵液收获 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，操作者需要取 5 mL 磁珠悬液用于目标蛋白的纯化。以下即以此为例进行详细说明：

1、将磁珠产品置于漩涡混匀器上充分混匀，用移液器取 5 mL 磁珠悬液于 15 mL 离心管中，进行磁性分离，弃上清液，从磁性分离器上取下离心管。

2、加入 5 mL Binding Buffer 到上述装有磁珠的离心管中，上下翻转离心管数次，使磁珠重新悬浮；进行磁性分离，移去上清液。重复洗涤 2 次。

（注：在磁性分离过程中，为了减少磁珠在使用过程中的损耗，待溶液变澄清后，盖紧离心管盖子，保持离心管仍在磁性分离器上，手持磁性分离器与离心管上下翻转数次，使澄清的溶液涮洗离心管盖上残留的磁珠，静置片刻，使溶液重新变澄清；以下同。）

四、目标蛋白与磁珠结合：

1、用 10 mL Binding Buffer 悬浮 2 g 湿重的菌体，进行破碎和裂解之后，即为目标粗蛋白样品，加入到装有预处理磁珠的离心管中，将离心管置于漩涡混匀器振荡 15 s。

2、将离心管置于旋转混合仪上，室温旋转混合 20~30 min（如果需要，可以在 2~8℃ 的低温环境下，旋转混 1 h，防止目标蛋白降解）。

3、将离心管置于磁性分离器上进行磁性分离，移出上清液至新的离心管中以备后续检测，从磁性分离器上取下离心管进行后续洗涤步骤。

五、磁珠洗涤：

1、加入 10 mL Washing Buffer 到装有磁珠的离心管中，轻轻翻转离心管数次，使磁珠重新悬浮，磁性分离，移出清洗液到新的离心管中，以备取样检测。重复此步骤 1 次。

2、加入 10 mL Washing Buffer 到装有磁珠的离心管，使磁珠重新悬浮，将磁珠悬液转移到新的离心管（避免原离心管壁上非特异性吸附蛋白污染目标蛋白），磁性分离，移出上清液到清洗液收集管。

六、目标蛋白洗脱：

1、操作者可根据需要改变洗脱体积调整目标蛋白浓度，加入 2~10 mL Elution Buffer，轻轻翻转离心管数次，使磁珠悬浮，磁性分离，收集洗脱液到新的离心管中，即为纯化的目标蛋白样品。

2、如果需要，可以重复上述步骤 1 次，收集样品到新的离心管中，以检测目标蛋白是否洗脱完全。

3、通过 SDS-PAGE 或 Western blotting 检测目标蛋白。 如果需要测定蛋白质浓度，可以采用 Elution Buffer 调零再进行测定，或者采用透析、超滤等方法去除 Imidazole 后再进行浓度测定。

七、磁珠后处理：

1、在装有磁珠的离心管中加入 5 mL Elution Buffer，上下翻转离心管数次，使磁珠悬浮，磁性分离，去除上清液。

2、重复上述步骤 2 次。

3、在离心管中加入 5 mL ddH_2O，上下翻转离心管数次，使磁珠悬浮，磁性分离，去除上清液。

4、重复上述步骤 2 次。

5、加入 Storage Buffer（20%（v/v）乙醇）到磁珠中使总体积为 5 mL，保存于 2~30℃（长期保存，置于 2~8℃），可用于下一次同种蛋白的纯化。

八、磁珠再生：

磁珠连续使用三次以上，其结合目标蛋白的能力可能会明显降低，建议进行磁珠再生处理。

以 5 mL 10%（v/v）磁珠悬液为例，详细说明磁珠再生操作：

1、将磁珠悬液进行磁性分离，去除上清液，从磁性分离器上取下离心管，在离心管中加入 5 mL ddH_2O，上下翻转离心管数次，使磁珠重新悬浮，磁性分离，去除上清液。

2、加入 5 mL Stripping Buffer，上下翻转离心管数次，使磁珠重新悬浮，室温旋转混合 5 min，磁性分离，去除上清液。重复此步骤 1 次。

3、加入 5 mL ddH_2O，上下翻转数次，使磁珠重新悬浮，磁性分离，去除上清液，重复此步骤 2 次。

4、碱处理：加入 5 mL Beads Washing Buffer，上下翻转离心管数次，使磁珠重新悬浮，室温旋转混合 5 min，磁性分离，去除上清液。加入 5 mL ddH_2O，上下翻转离心管数次，使磁珠重新悬浮，磁性分离，去除上清液。重复 ddH_2O 洗涤步骤 3~5 次，至洗涤液呈中性为止。

5、加入 5 mL Recharge Buffer，上下翻转离心管数次，使磁珠重新悬浮，室温旋转混合 20 min，磁性分离，去除上清液。

6、加入 5 mL ddH_2O，上下翻转离心管数次，使磁珠重新悬浮，磁性分离，去除上清液。重复此步骤 4 次以上，保证镍离子去除完全。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.
注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。

7、加入 Storage Buffer 到磁珠中使总体积为 5 mL，保存于 2~30℃ （长期保存，置于 2~8℃）。

蛋白纯化方法的优化：

以上操作方法适用于大部分组氨酸标签蛋白的纯化，根据目标蛋白与金属离子螯合磁珠的结合性能不同，操作者可以从以下几个方面对纯化方法进行优化，以提高目标蛋白的回收率和纯度。

一、提高目标蛋白回收率的参考方法：

1、降低样品溶液和 Binding Buffer 中的 Imidazole 浓度；

2、样品溶液和其它缓冲液中添加表面活性剂等物质；

3、添加合适的蛋白酶抑制剂，防止目标蛋白降解；

4、增加磁珠用量；

5、延长蛋白与磁珠孵育的时间；

6、延长洗脱目标蛋白的时间或增加洗脱次数。

二、提高目标蛋白纯度的参考方法：

1、提高样品溶液和 Binding Buffer 中 Imidazole、NaCl 的浓度；

2、样品和缓冲液中添加表面活性剂等物质；

3、添加合适的蛋白酶抑制剂，防止目标蛋白降解；

4、延长洗涤的时间，增加洗涤次数；

5、采用梯度 Imidazole 浓度洗脱目标蛋白。

注意事项：

1、磁珠使用和保存过程中应避免冷冻、干燥和高速离心等操作；

2、在使用本产品前，请务必充分振荡使磁珠保持均匀的悬浮状态；

3、请选用质量好的移液器吸头和离心管，以免磁珠贴壁或混合过程发生渗漏引起磁珠的损耗；

4、磁珠与溶液混合过程中，如果溶液粘稠无法通过翻转离心管重悬磁珠，可采用移液器反复吹吸或短时漩涡混合使磁珠充分重悬；

5、操作者可根据实际需要保留经磁性分离移去的上清液，进行取样检测，以便分析纯化过程和优化蛋白纯化流程；

6、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；

7、使用过的磁珠重复使用时，建议纯化同种蛋白，纯化不同种类的蛋白时，建议使用新的磁珠；

8、本产品需与磁性分离器配套使用；

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；

10、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

保存条件：

4℃保存，保质期 2 年（可在常温下短时间储存或运输）。

附录：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
	DTT	5 mM	
	β-mercaptoethanol	20 mM	

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.
注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。

	TCEP	5 mM	用还原剂的溶液处理磁珠。
	Reduced Glutathione	10 mM	
变性剂	Urea	8 M	
	Guanidine Hydrochlride	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，pH7.4	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	
	Na2SO4	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	

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.
注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。

电话：400-600-4213　　邮箱：techserv@labgic.com