上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话：021-61312973　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：shyysw@sina.com

His-Tag 蛋白纯化磁珠（钴离子）IDA-Cobalt

货号：R32299

规格：5ml，2*50ml

保存温度：2-8℃保存，有效期 12 个月。

产品介绍：

组氨酸标签蛋白纯化磁珠具有超顺磁性，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。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，极大地简化纯化工艺和提高纯化效率，适合科研和工业领域便捷地进行组氨酸标签蛋白纯化。

与传统层析方式使用的金属螯合琼脂糖预装柱相比，采用磁珠纯化组氨酸标签蛋白，无需对样品进行多次长时间的高速离心和滤膜过滤、无需控制流速、更无需高昂的层析设备。样品与磁珠的特异性结合、洗涤以及目标蛋白的洗脱变得简单、快速、易操作。对于熟练的操作者而言，在 1 h 内就能获得高纯度的目标蛋白，且能轻松实现高通量和大规模样品的平行处理，为研究者节省了时间和成本。

本产品系列包括镍离子（Nickel）、钴离子（Cobalt）两种金属离子螯合磁珠，它们在目标蛋白结合量和非特异性吸附等性能上有所区别，用户可根据目标蛋白与不同种类金属的结合性能，以及对目标蛋白的产量和纯度的要求，选择不同种类的金属离子螯合磁珠。

产品特性：

产品名称	镍离子螯合磁珠	钴离子螯合磁珠
磁珠粒径范围	30~ 150 μm	
螯合金属离子	Ni2+	Co2+
金属离子密度	30~50 μmol/ mL 磁珠	
蛋白结合量	30~40 mg/mL （100%磁珠）	20~30 mg/mL （100%磁珠）
工作温度	2~30℃	
悬液浓度	10%（v/v）磁珠悬液	
保存液	20%（v/v）乙醇	

注意：

1、磁珠蛋白结合量与目标蛋白特性有关，此处仅做参考值

2、1 mL 磁珠悬液中包含 100 μL 磁珠

适用范围：

适用于纯化细菌、酵母、昆虫和哺乳动物细胞等分泌或胞内表达的可溶性组氨酸标签蛋白，也可用于变性蛋白的纯化（包涵体需变性后再进行纯化）。

操作步骤：（仅供参考）

1、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，用户应该自行设计实验，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。

增加咪唑浓度进行洗脱是组氨酸标签纯化磁珠最常用的洗脱方法，首次使用时，在不确定最佳的洗脱咪唑浓度情况下，推荐在缓冲液中分别加入 10 mM、20 mM、50 mM、100 mM、200 mM、300 mM、400 mM、500 mM 咪唑，浓度从低到高分别洗脱，磁吸后收集蛋白上清液，之后通过 SDS-PAGE 电泳等方法鉴定洗脱结果。

以下提供的缓冲液体系适用于多数组氨酸标签蛋白的纯化，供用户参考。

Binding Buffer： 20 mM Phosphate Buffer，500 mM NaCl，5~50 mM Imidazole，pH7.4

Washing Buffer： 20 mM Phosphate Buffer，500 mM NaCl，50~100 mM Imidazole，pH7.4

Elution Buffer： 20 mM Phosphate Buffer，500 mM NaCl，500 mM Imidazole，pH7.4

2、样本处理

（1）大肠杆菌、酵母等细胞内表达蛋白：表达细胞用适量的 Binding Buffer 稀释，加入蛋白酶抑制剂（如终浓度为 1 mM 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，冰浴 30 min，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。

3、磁珠预处理

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：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，用户需要取 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。

（*：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。）

4、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。

5、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。

6、目标蛋白洗脱

（1）用户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。

7、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 ddH2O，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 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。

8、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。

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 NiSO4 / CoCl2 （该化学试剂具有一定的毒性，可能造成过敏反应，使用时务必注意自身安全）Storage Buffer：20%（v/v）乙醇以 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 ddH2O， 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 ddH2O，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 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 ddH2O，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 ddH2O 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 ddH2O，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。

（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℃）。

蛋白纯化流程的优化：

以上操作流程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， 用户可以从以下几个方面对纯化流程进行优化，以提高目标蛋白的回收率和纯度。

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。

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、首次使用本产品前，请务必详细阅读本用户手册；

2、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；

3、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；

4、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；

5、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；

6、用户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；

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；

9、本产品需与磁性分离器配套使用；

10、本产品仅供研究使用。