

His 标签蛋白琼脂糖磁珠

产品描述

Biolinkedin® His 标签蛋白琼脂糖磁珠是由高度交联的 4%磁性琼脂糖磁珠为基质,用于纯化各种表达系统融合表达的 His 标签重组蛋白。

产品信息

项目	His 标签蛋白琼脂糖磁珠
基质	高度交联的 4%磁性琼脂糖磁珠
载量	>20 mg 6xHis 蛋白
粒径	30-100µm
磁珠比例	20% (V/V)
储存缓冲液	20% 乙醇
保质期	在 2-8°C 稳定保存, 保质期两年

纯化步骤

1. 准备 buffer

结合/平衡缓冲液	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10 mM 咪唑, pH 8.0
洗涤缓冲液	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 20 mM 咪唑, pH 8.0
洗脱缓冲液	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 250 mM 咪唑, pH 8.0

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22µm 或 0.45µm 滤膜过滤。减少杂质,提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

注: 上述缓冲液适用多数 His 标签蛋白纯化,结合/平衡缓冲液中加入一定咪唑有助于降低非特异性结合,用户也可根据实验结果调整缓冲液中的咪唑浓度。

2. 样品准备

以大肠杆菌表达系统为例

- 1). 4°C 离心 30 分钟 (4000 g) 收集菌体, 弃上清。
- 2). 用冷结合/平衡缓冲液重悬细胞, 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 10µg/mL) 和 DNase I (终浓度 5µg/mL) 并在冰上孵育 10-15 分钟。

- 4) 4°C 离心 20 分钟 (12,000 g, 除菌过滤, 并小心将上清和沉淀分离。

- 5). 用 SDS-PAGE 分析 His 标签蛋白的含量及可溶性。

3. 纯化重组 His 标签蛋白

- 1). 将 His 标签蛋白琼脂糖磁珠充分混匀, 使用移液器取适量的磁珠悬浮液, 置于离心管中, 磁性分离, 弃上清。

- 2). 加入与上述磁珠悬浮液等体积的平衡缓冲液, 使用移液器反复吹打 5-10 次, 磁性分离, 弃上清, 重复洗涤 2 次。

- 3). 将制备好的含有 His 标签蛋白澄清菌液加入到处理好的磁珠中, 颠倒混匀。将离心管置于混匀仪上, 室温孵育 30min。(也可置于 2-8°C 孵育 1h 或者过夜)

- 4). 结合结束后, 将离心管置于磁力架上, 磁性分离, 弃上清 (保留, 以备检测)。向离心管中加入 2 倍悬浮液体积的洗涤缓冲液, 移液器反复吹打 5-10 次, 然后磁性分离, 用移液器吸取上清 (保留, 以备取样检测)。重复上述步骤 3 次。

- 5). 洗脱蛋白时可根据需要调整洗脱体积从而调整蛋白浓度的目的。建议用 2-5 倍柱体积的洗脱缓冲液加入到离心管中, 移液器轻轻吹打 3-5 次, 混匀, 磁性分离, 然后用移液器吸取上清液, 即为目的蛋白。如有需要, 可以重复上述步骤 1 次, 以提高蛋白回收量。

- 6). SDS-PAGE 检测纯化效果。

4. 磁珠处理

- 1). 将装有磁珠的离心管中加入 1mL 洗脱缓冲液, 用移液器反复吹打 3-5 次, 使磁珠重复悬浮, 然后置于磁力架, 磁性分离, 弃上清, 重复该操作 2 次。向离心管中

加入 1mL 去离子水，用移液器反复吹打 3-5 次，使磁珠重复悬浮，然后置于磁力架，磁性分离，弃上清，重复该操作 2 次。最后加入 20%乙醇中，使总体积等于初始悬浮液体积，置于 2-8°C 保存。

5. 可能遇到的问题及解决办法

问题	原因	解决方案
洗脱组分中没有目的蛋白	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	提高 wash Buffer 的 pH，或者降低咪唑浓度。
	融合蛋白被蛋白酶降解	在裂解步骤或洗涤步骤加入适量的蛋白酶抑制剂，如 PMSF。
	融合蛋白不能有效地从磁珠上洗脱下来	降低 Elution Buffer 的 pH 值，或者增加 Elution Buffer 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
回收的重组蛋白不纯	洗杂不彻底	增加 Wash Buffer 体积。
	样品中含有其他的组氨酸标签蛋白	通过调节 pH 值，或者咪唑浓度来优化洗杂条件。然后通过使用其他的纯化方式（如离子交换，疏水等）进一步纯化洗脱组分。
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。
	操作温度太低	室温下进行上样。