

## BeyoMag™ His标签蛋白纯化琼脂糖磁珠(NTA-Ni)

产品编号	产品名称	包装
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

### 产品简介:

- 碧云天的BeyoMag™ His标签蛋白纯化琼脂糖磁珠(NTA-Ni), 英文名为BeyoMag™ NTA-Ni Magnetic Agarose Beads for His-Tag Protein Purification, 即NTA-Ni His标签蛋白纯化磁珠、NTA-Ni琼脂糖磁珠(Magarose)、NTA-Ni磁珠或NTA镍磁珠, 由高质量的次氨基三乙酸(Nitrilotriacetic acid, NTA)共价偶联至琼脂糖磁珠, 再通过NTA的4个结合位点螯合二价镍离子(Ni<sup>2+</sup>)制备而成, 可特异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)。本产品可以耐受6M盐酸胍或8M尿素。
- 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。
- 本产品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]。
- BeyoMag™ His标签蛋白纯化琼脂糖磁珠(NTA-Ni)可特异地结合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应用于带有His标签的融合蛋白或其蛋白复合物的纯化或免疫沉淀等实验。本产品的工作原理与操作流程请参考图1。

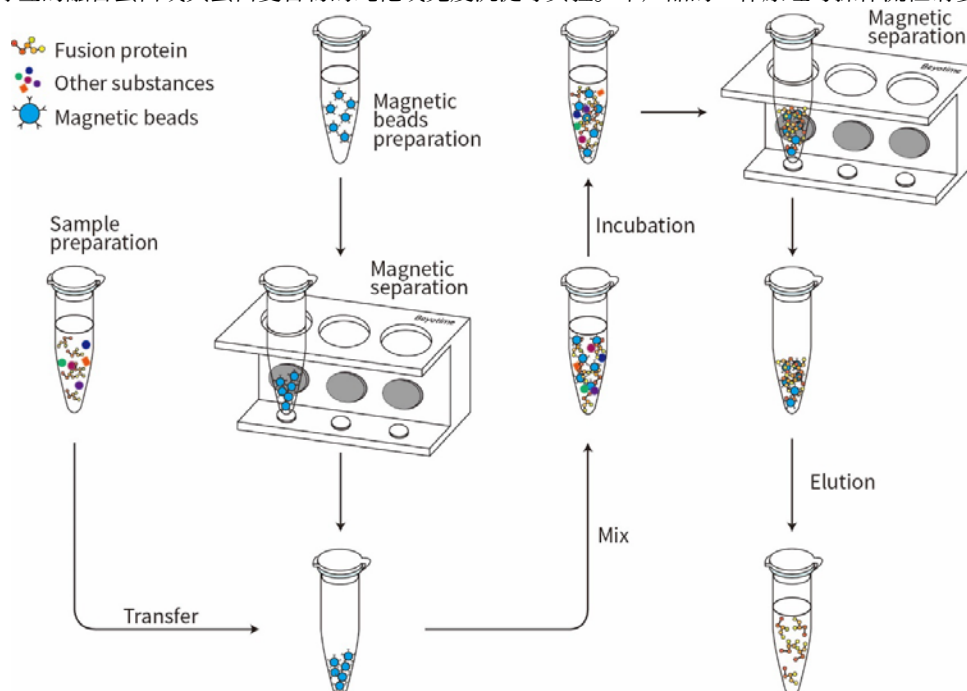


图1. 碧云天BeyoMag™ His标签蛋白纯化琼脂糖磁珠(NTA-Ni) (P2241)工作原理与操作流程。

- **本产品稳定性高、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，本产品镍离子配基密度较高，镍离子脱落程度更低，对带有His标签蛋白的结合具有很强的特异性。本产品每毫升悬浊液含约25%琼脂糖磁珠沉淀，含有不少于30μmol/ml的NTA-Ni<sup>2+</sup>，通常每毫升磁珠(100%磁珠)可结合>20mg 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。
- **本产品可结合多种形式的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)。
- **本产品结合目的蛋白速度快。**本产品使用了NTA螯合的镍离子，粒径在100μm左右。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。
- **本产品可高效洗脱His标签蛋白。**本产品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。本产品及国外同类产品Competitor Q用于His标签融合蛋白的纯化效果参考图2。

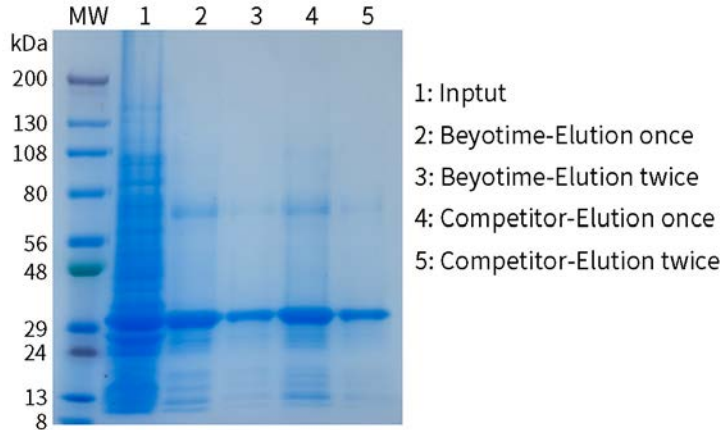


图2. 碧云天BeyoMag™ His标签蛋白纯化琼脂糖磁珠(NTA-Ni) (P2241)用于His标签融合蛋白的纯化效果图。样品1为细菌裂解液，即大肠杆菌中His标签融合蛋白全细菌裂解液；样品2、3分别为BeyoMag™ His标签蛋白纯化琼脂糖磁珠(NTA-Ni)洗脱第一次、第二次的样品；样品4、5分别为Q公司同类产品(Competitor Q)洗脱第一次、第二次的样品。实际结果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，本图仅供参考。

- **本产品使用便捷。**本产品储存在特殊保护液中，不含甘油，可以通过磁性吸附实现快速高效的分离，无需离心操作。
- 本产品的主要指标如下表：

Characteristics	Description
Product content	25% slurry in specific protective buffer
Beads size	30~150μm
Magnetization	Superparamagnetic
Coupled Ligand	Nitrilotriacetic acid (NTA)
Chelating metal ion	Ni <sup>2+</sup>
Metal ion density	>30μmol/ml beads
Binding capacity	>20mg 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

- 本产品每毫升悬浊液中共含约0.25ml琼脂糖磁珠沉淀。本产品标注的体积为悬浊液总体积。每毫升悬浊液可以用于纯化约5mg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。

**包装清单：**

产品编号	产品名称	包装
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
—	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NTA-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。
- 本产品需维持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。

- 本产品使用过程中，缓冲试剂如Tris、HEPES、MOPS等的浓度不宜超过100mM，EDTA或EGTA等螯合剂的浓度不宜超过1mM，避免含有Glycine等伯胺类试剂，DTT、DTE等还原剂的浓度不宜超过1mM，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。
- 本产品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。
- 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。
- 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。
- 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：

本步骤以最常见的大肠杆菌中表达纯化His标签重组蛋白为例进行详细说明。通常大肠杆菌500ml菌液得到2-4g湿重的菌体，通过实验估算目标蛋白产量为10-20mg，需要2-4ml磁珠悬液用于目标蛋白的纯化，可以根据实际情况进行放大或缩小。

### 1. 缓冲液的准备。

Buffer	Components
Binding/Wash Buffer	10mM Tris, 500mM NaCl, 20mM Imidazole, pH7.4
Elution Buffer	10mM Tris, 500mM NaCl, 500mM Imidazole, pH7.4

注1：所用水和缓冲液在使用之前建议用0.22μm或0.45μm孔径滤膜过滤，以减少杂质，提高His标签蛋白纯化效率。

注2：推荐的缓冲液适用于大多数His标签蛋白的纯化。对于特殊样品，需自行进行适当的优化或参考常见问题。

### 2. 样品的制备。

a. 收集大肠杆菌菌液至离心管中，4°C 4,000×g离心20分钟或4°C 15,000×g离心1分钟，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15分钟。

b. 用Binding/Wash Buffer重悬沉淀，如果需要，可加入适量的蛋白酶抑制剂混合物，如碧云天的蛋白酶抑制剂混合物(His-Tag蛋白纯化用，100X) (P1030/P1031)。

注1：根据His标签重组蛋白表达的丰度，菌液和Binding/Wash Buffer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，每毫升菌液的沉淀(约10mg)可以加入200μl Binding/Wash Buffer；表达丰度非常低时，每毫升菌液的沉淀(约3mg)可以加入40μl Binding/Wash Buffer。

注2：加入的蛋白酶抑制剂混合物不能对His标签蛋白纯化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、巯基乙醇等还原剂的浓度不宜超过1mM。

c. 冰上超声裂解细菌。超声功率200-300W，每次超声处理10秒，每次间隔10秒，共超声处理6次，即为粗蛋白样品。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。

注：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分钟，以降解核酸。另外，也可以根据实际需要可对蛋白样品进行离心操作。推荐使用BeyoZonase™超级核酸酶(≥99%) (D7121)。

### 3. BeyoMag™ His标签蛋白纯化琼脂糖磁珠(简称NTA-Ni磁珠)的准备。

a. 用移液器轻轻吹打重悬NTA-Ni磁珠，按照每5mg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NTA-Ni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或适当更大体积的Binding/Wash Buffer洗涤磁珠。

b. 用移液器轻轻吹打重悬NTA-Ni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。以下同。

### 4. 目标蛋白与磁珠结合。

a. 加入磁珠与孵育。按照每5mg目标蛋白(分子量约为60kD)样品(通常约10ml，具体蛋白样品用量与目的蛋白表达水平有关)加入1ml磁珠悬浊液的比例加入NTA-Ni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)。

b. 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。

c. 洗涤。加入2ml的Binding/Wash Buffer，用移液器轻轻吹打重悬NTA-Ni磁珠。置于磁力架上分离10秒，去除上清。重复洗涤三次。

### 5. 洗脱。



- a. 根据目标蛋白的浓度及后续实验要求, 可以加入0.2-1ml Elution Buffer, 轻轻翻转离心管数次, 摇床摇动洗脱10分钟, 磁性分离, 收集洗脱液到新的离心管, 即为纯化的His标签蛋白。
- b. 如果需要, 重复上述步骤一次, 收集样品到新的离心管中, 还可以得到一些His-Tag蛋白。
6. 磁珠的清洗和再生。
- a. 向离心管加入2ml Elution Buffer, 上下翻转离心管数次, 使磁珠重悬, 涡旋10秒, 磁性分离, 去除上清。重复3次。
- b. 向离心管中加入2ml 20%乙醇, 上下翻转离心管数次, 使磁珠重悬, 涡旋10秒, 磁性分离, 去除上清。重复3次。
- c. 磁珠保存在20%乙醇中, 使总体积等于初始悬浮液体积, 置于2-30°C (长期保存, 置于2-8°C), 可用于下一次同种蛋白的纯化。

#### 常见问题:

Problem	Possible Causes	Solution
Very few or no His-tagged protein exists in the eluate.	Protein is not completely eluted.	1. Increase the Imidazole concentration of elution buffer. 2. Increase the elution or incubation time.
	No target protein expressed.	Make sure the protein of interest contains the His-tag by Western blot or dot blot analyses.
	Very low protein expression level.	1. Use larger volume of cell lysate. 2. Optimize expression conditions to raise the protein expression level.
	Washes are too stringent.	Reduce the time and number of washes.
	Incubation times are inadequate.	Increase the incubation time.
	Interfering substance is present in sample.	Lysates containing high concentration of DTT, 2-mercaptoethanol, or other reducing agents may inhibit protein binding, and must be used at the recommended concentrations.
	Detection system is inadequate.	If Western blot detection is used: 1. Check primary and secondary antibodies using proper controls to confirm binding and reactivity. 2. Verify that the transfer was adequate by using pre-stained protein marker or staining the membrane with Ponceau S. 3. Use fresh detection substrate or try a different detection system.
The purity of the target protein is low.	There are other polyhistidine-rich proteins in sample	Try a pH step gradient elution or an imidazole step gradient elution.
	Washes are insufficient.	1. Increase the number of washes at least 2 folds. 2. Prolong duration of the washes, incubating each wash for at least 15 minutes. 3. Increase imidazole concentration in the wash solutions. 4. Centrifuge at lower speed to avoid nonspecific trapping of denatured proteins.
The binding capacity of the magnetic beads has declined.	Protein or other substances have aggregated on the beads	Wash the beads with NaOH
	The beads have been reused too many times.	Use new beads.

#### 参考文献:

- Bromberg R, Cai K, Guo Y, Plymire D, Emde T, et al. Front Mol Biosci. 2022. 9:912072.
- 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
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
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
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
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
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/盒
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
FMS081	BeyoMag™磁分离架(96孔, PCR板, 蓝)	1个/盒
FMS085	BeyoMag™磁分离架(96孔, 平底板, 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
FMS082	BeyoMag™磁分离架(96孔, PCR板, 铝合金)	1个/盒
FMS086	BeyoMag™磁分离架(96孔, 细胞培养板, 铝合金)	1个/盒

Version 2023.08.08