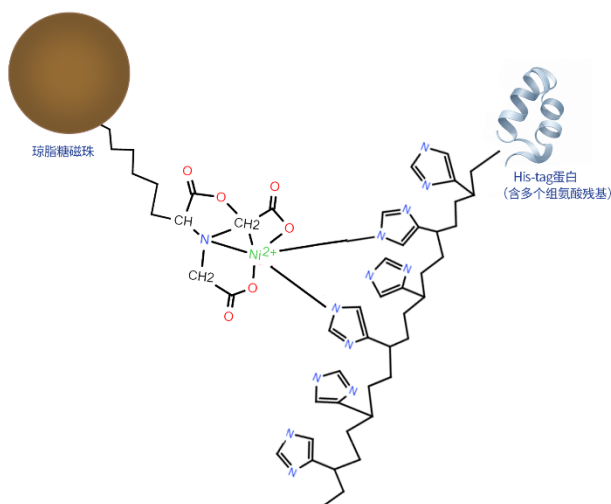


1、适用场景

MagneStar® MA-Ni NTA琼脂糖磁珠适用于小规模地纯化/筛选不同来源的组氨酸标签蛋白。使用琼脂糖磁珠上固定的镍离子捕获组氨酸标签蛋白，结合磁分离装置，能够在纯化方案的不同步骤中实现磁珠-液相体系的快速分离。

2、基本原理

金属螯合层析是利用蛋白质表面带供电子基团的氨基酸，如组氨酸（Histidine）、半胱氨酸（Cystine）、色氨酸（Tryptophan），与固定在介质上的金属离子（通常是 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 等）通过配位键形成稳定的络合物，从而有效捕获带有His标签的重组蛋白，或者自身序列中含有多个组氨酸、半胱氨酸和色氨酸的天然蛋白，达到分离纯化的目的。



3、注意事项

MagenStar® MA-Ni NTA磁珠商品包装使用的是20%乙醇溶液，使用前需要将分散介质置换为纯水或平衡缓冲液。

磁珠不可冷冻！ 冷冻会带来不可逆的变性。

在使用之前，特别是从大瓶中分装时，应当将其中的分散液充分混匀，然后再移取。

4、基本流程

① 缓冲液配置：

平衡缓冲液：20 mM磷酸钠，500 mM氯化钠，5 – 60 mM咪唑，pH=7.4。

洗脱缓冲液：20 mM磷酸钠，500 mM氯化钠，500 mM咪唑，pH=7.4。

注意：固定化金属亲和层析(IMAC)纯化组氨酸标记蛋白是产量和纯度之间的平衡。样品和平衡缓冲液中咪唑浓度低可提高收率，而咪唑浓度高可提高纯度。还要注意咪唑的最佳浓度与样品有关。为了简化纯化程序，本说明书中包含两种纯化方案，一种侧重于高回收率，另一种侧重于高纯度。用户使用需根据自身实际情况调整方案。

② 高回收率方案：

该方案适用于获得大量组氨酸标记蛋白的情况。在平衡和洗涤过程中使用低咪唑浓度以获得高回收率。以磁力架和2 mL离心管为例：

- a) 磁珠的取用：将磁珠分散液置于滚轴混匀仪上充分混匀，取200 μ L磁珠分散液加入2 mL离心管中。离心管置于磁力架上，除去保存液；
- b) 平衡：加入500 μ L含有5 mM咪唑的平衡缓冲液，振荡使磁珠重悬，磁分离除去液体；
- c) 结合：平衡后立刻加入1 mL含有5 mM咪唑的待纯化样品。如果样品少于1 mL，用平衡缓冲液补足至1 mL。用振荡器设置500 rpm/min重悬磁珠并孵育30 min，磁分离除去液体；
- d) 漂洗：加入500 μ L含有5 mM咪唑的平衡缓冲液，振荡使磁珠重悬，磁分离除去液体。共清洗3次；
- e) 洗脱：加入100 μ L洗脱缓冲液，使磁珠重悬，在振荡器上设置500 rpm/min洗脱10 min，磁分离收集洗脱液。如有需要，可进行二次洗脱。

③ 高纯度纯化方案：

该方案适用于优先获得高纯度组氨酸标签蛋白的情况。在平衡和洗涤期间，使用较高的咪唑浓度(20至60 mM)获得高纯度。注意:最佳咪唑浓度于蛋白质性质有关。对于弱结合组氨酸标签的蛋白质，20 mM可能是最佳的；而对于强结合组氨酸标签的蛋白质，60 mM可能是最佳的。我们以磁力架和2 mL离心管为例：

- a) 磁珠的取用：将磁珠分散液置于滚轴混匀仪上充分混匀，取200 μ L分散液加入2 mL离心管中。离心管置于磁力架上，除去保存液；
- b) 平衡：加入500 μ L含有20 – 60 mM咪唑的平衡缓冲液，振荡使磁珠重悬，磁分离除去液体；
- c) 结合：平衡后立刻加入1 mL含有20 – 60 mM咪唑的待纯化样品。如果样品少于1 mL，用平衡缓冲液补足至1 mL。用振荡器设置500 rpm/min重悬磁珠并孵育30 min，磁分离除去液体；
- d) 漂洗：加入500 μ L含有20 – 60 mM咪唑的平衡缓冲液，，振荡使磁珠重悬，磁分离除去液体。共清洗3次；
- e) 洗脱：加入100 μ L洗脱缓冲液，使磁珠重悬，在振荡器上设置500 rpm/min洗脱10 min，磁分离收集洗脱液。如有需要，可进行二次洗脱。

5、条件优化

本说明书中推荐的方案适用于大多数组氨酸标记蛋白的纯化。有些条件可能需要优化。可能需要优化的条件包括如下：

- ① 样本体积；
- ② 磁珠数量；
- ③ 洗涤液咪唑浓度；
- ④ 洗涤次数；
- ⑤ 缓冲液组成、pH值。