UltraBio™ Anti-His Magnetic Beads

A751541

储存温度　　2-8℃储存。禁止冻结。

产品介绍

His 标签是由 6 个或 8 个组氨酸残基组成的短肽标签，可通过重组 DNA 技术融合于目的蛋白的 N 端或 C 端。该标签具有分子量小、对目的蛋白天然功能干扰低、分离纯化便捷等显著优势，是目前生物实验中应用最广泛的亲和纯化融合标签之一。His 标签肽段可通过组氨酸残基与镍离子特异性结合，基于这一特性，带有 His 标签的重组蛋白可被镍柱特异性吸附，进而实现快速高效的亲和纯化，为目的蛋白的分离富集提供便捷手段。

Anti-His 抗体可特异性识别与 His 标签融合表达的目的蛋白，广泛应用于该类融合蛋白的表达验证、细胞内定位分析，同时可用于融合蛋白的亲和纯化、定性及定量检测。本公司研发的 Anti-His 抗体亲和力极高、特异性强，适配 Western blot(WB)、免疫沉淀(IP)等蛋白表达检测及蛋白互作相关实验。

本产品所用高聚物磁珠，采用先进高分子聚合技术将超顺磁性材料与高分子基质完美结合，兼具快速磁响应性与优异的微球分散性，同时具备极低的非特异性吸附特性及丰富的配体结合位点，可高效适配 Anti-His 抗体偶联及后续 His 标签融合蛋白的捕获实验。磁珠具体性能参数详见下表。

技术参数

项目	技术参数
微球基质	高聚物磁性微球
配体	Anti-His 重组标签抗体(鼠抗)
粒径	1 μm
磁珠浓度	10 mg/mL
储存缓冲液	Tris (pH 8.0), 0.01% Tween 20, 0.1% ProClin 300.

使用方法

本操作流程主要为蛋白互作实验，每次反应使用 20 μL UltraBio™ Anti-His Magnetic Beads，使用流程可参考图 1。

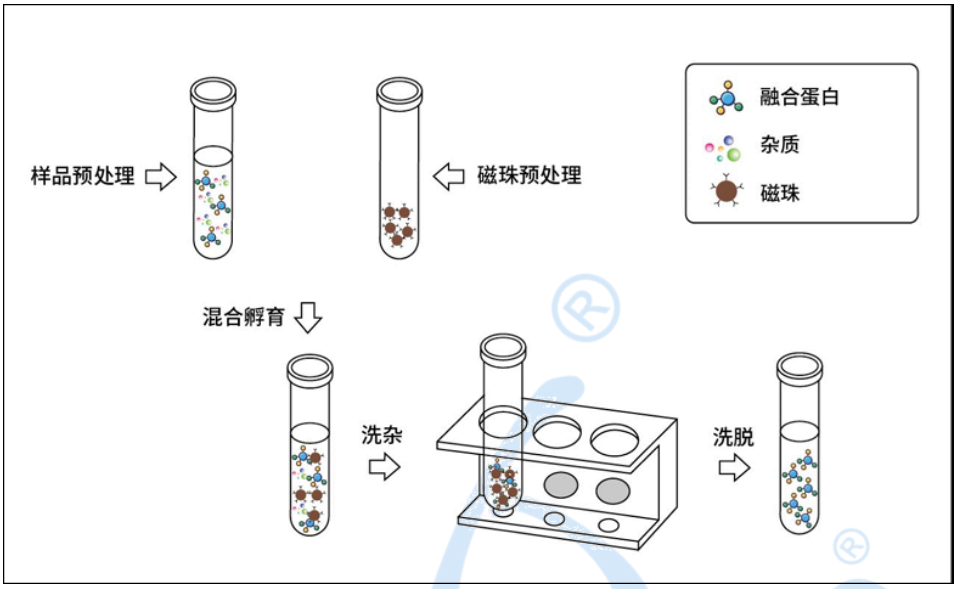

图 1：UltraBio™ Anti-His Magnetic Beads 使用流程图

1. 推荐缓冲液(自备)

缓冲液名称	试剂配制
洗杂缓冲液	20 mM Na_2HPO_4, 0.15 M NaCl, 0.05% (v/v) Tween-20, pH 7.4
洗脱液	0.1 M Glycine, 0.15 M NaCl, pH 3.0
中和缓冲液	1 M Tris-HCl, pH 8.0

2. 磁珠漂洗

2.1. 取 20 μL 混匀后的磁珠置于 1.5 mL 离心管中，加入 500 μL 洗杂缓冲液，轻柔上下颠倒混匀 5–10 次(勿涡旋)。

2.2. 将离心管置于磁力架上，待磁珠完全吸附(约 30 s–1 min)后，吸弃全部上清(避免吸到磁珠)。

2.3. 重复上述步骤 4 次，总计完成 5 次漂洗，最后一次漂洗后尽量吸尽上清，保留磁珠备用。

3. 样品孵育

3.1. 向上述漂洗好的磁珠中加入 500-1000 μL 的细胞裂解样品，常温或 4℃下孵育 60 min(建议在旋转混匀仪上孵育，使样品和磁珠充分接触)。

3.2. 孵育结束后，将离心管置于磁力架上，待磁珠全部吸附后，将上清转移至新的离心管中，留样备检。

3.3. 向离心管中加入 500 μL 洗杂缓冲液，轻轻颠倒混匀 5-10 次后将离心管置于磁力架上，待磁珠完全吸附后弃去上清。

3.4. 重复操作 5 次。

注：孵育温度和时间范围推荐为：室温、0.5 h-2 h 或者 4℃、1 h-4 h，根据实际的结合效果适当调整孵育时间，一般情况下不建议过夜孵育，过夜孵育可能会引起过多的非特异性吸附。

磁珠每次洗涤，加入洗杂缓冲液后可以冰上静置 3-5 min。

4．蛋白洗脱

4.1. 洗脱液洗脱

每 20 μL 原始磁珠体积加入 40 μL 洗脱液，常温或 4℃洗脱 5-10 min，期间轻轻混匀 3-5 次。孵育结束后将离心管置于磁力架上，待磁珠完全吸附后，吸取上清至新的离心管中，加入少量的中和缓冲液将 pH 调至中性，最后进行 Western 检测。

4.1. SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱

每 20 μL 原始磁珠体积加入 60 μL 的 1× SDS Loading Buffer，轻摇摇晃混匀后 95-100℃高温处理 5-10 min。将离心管置于磁力架上分离 10 s，取上清进行 SDS-PAGE 电泳或进行 Western 检测。

注意事项

1. 本产品保存在 2-8℃，不可冻结保存；
2. 本产品出现轻微团聚属正常现象，可正常使用；
3. 本产品不要使用含有 DTT 等还原剂的细胞裂解液样品，DTT 可能会导致抗体配体的脱落；
4. 本产品能耐受≤2 M 尿素，高浓度的尿素会导致抗体配体脱落；
5. 在清洗和洗脱时避免吸取到磁珠，清洗时吸取到磁珠会影响最终的载量，洗脱时吸取到磁珠会影响目的蛋白的质量和电泳效果，第一次洗脱后可以将洗脱液置于新的离心管中，再次置于磁力架上进行吸附。

常见问题及解答

Q：聚合物磁珠和琼脂糖磁珠有何区别？

A：

琼脂糖磁珠是带孔微球，粒径在 30-100 μm，交联时会有一部分配体会进入球孔内部，所以偶联载量相对较高，适用于蛋白的快速纯化；而聚合物磁珠通常粒径为 1-3 μm 以下，配体主要分布在微球表面，这种类型的磁珠能够快速结合蛋白，空间位阻影响小，适用于蛋白互作实验，但其载量不高；

推荐使用琼脂糖磁珠进行蛋白纯化实验，使用聚合物磁珠进行蛋白互作实验如 IP、Co-IP 和 Pull-down 实验等。

Q：为何结合不到目的蛋白？

A：

目的蛋白无表达或表达量过低：建议纯化前用 Western blot (WB) 检测原始表达量，WB 无信号则难以捕获；

样本含高浓度还原剂(如 DTT、β-ME)：破坏抗体二硫键导致配体脱落，需选用无还原剂的温和裂解液；

Flag 标签被空间位阻遮挡：融合蛋白折叠导致标签隐藏，可尝试将标签移至蛋白 N 端 / C 端或增加柔性连接肽(如 $(GGS)_n$)；

孵育条件不足：温度 / 时间未优化(如室温孵育 < 30 min、4℃孵育 < 1 h)，或未旋转混匀导致结合不充分；

磁珠用量不足：按样本中目的蛋白量调整磁珠体积(通常 20 μL 磁珠对应 1–5 mg 总蛋白)；

洗涤过于剧烈：剧烈涡旋导致结合蛋白脱落，建议轻柔颠倒混匀而非涡旋。

实例

1. His tag IP 实验：样品为胞内表达蛋白，含有 His 和 Flag 标签；
2. 取 0.5 mL 悬浮细胞(≈1.5×10^6 个)常温下 1×PBS(pH 7.4)清洗三次后快速进行裂解、离心；
3. 加入 20 μL 已经清洗过的磁珠于离心后的上清中摇晃孵育 30 min；
4. 将含有磁珠的样品管转移到磁力架上，分离磁珠和液体，用移液器吸走上清，留下磁珠；
5. 用洗杂缓冲液清洗 5 次后加入 1× SDS Loading Buffer 99℃高温处理 10 min 后进行 WB；
6. 检测抗体为 Anti-Flag-HRP mAb，阴性对照(-)为未偶联 Anti-His 抗体的空白高聚物磁性微球与样本孵育，结果请见图 2。

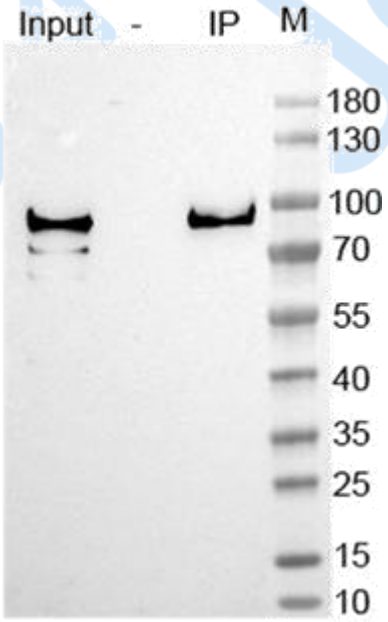

图 2：通过 UltraBio™ Anti-His Magnetic Beads 进行 IP 后的 WB 图。

图 2 表明 UltraBio™ Anti-His Magnetic Beads 能够很好的捕获样品中的 His 标签融合蛋白，同时没有非特异性的蛋白结合。