



# Ni NTA Magarose Beads

## 目录

1. 产品介绍.....	1
2. 注意事项.....	2
3. 纯化流程.....	2
4. 订购信息及相关产品.....	4

## 1. 产品介绍

**Ni NTA Magarose Beads** 是专为高效、快速纯化组氨酸标签蛋白而设计的新型磁性微球产品，可以在磁场作用下直接从生物样品中一步纯化出高纯度的目标蛋白，极大的简化了纯化工艺和提高纯化效率，适合科研和工业客户高通量地进行组氨酸标签蛋白的纯化。

与传统的柱层析方法相比，使用 **Ni NTA Magarose Beads** 无需控制上样流速，更不需要昂贵的层析设备和离心设备，样品与磁珠的结合以及目的蛋白与磁珠的分离变的非常简单、快捷，而且更容易实现高通量、自动化的蛋白纯化方法。

**Ni NTA Magarose Beads** 是以 4%琼脂糖凝胶为基质，通过化学方法偶联了四配位的氮川三乙酸（NTA），螯合镍离子（Ni<sup>2+</sup>）后，可以形成非常稳定的八面体结构，镍离子处于八面体的中心，这样的结构很有效的保护了镍离子免受小分子的进攻（产品结构见图 1 所示，三种产品结构的区别），更加稳定，具体性能见表 1。

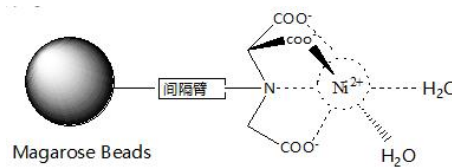


图 1. Ni NTA Magarose Beads 产品化学结构示意图

表 1. Ni NTA Magarose Beads 产品性能

项目	性能
基质	磁性琼脂糖微球
载量	>40 mg 6×His-tagged protein/ml 磁珠
磁珠粒径	30-100 μm
磁珠比例	磁珠悬浮于保护液中，含量为 20% (V/V)
保护液缓冲液	含 20%乙醇的 1XPBS
储存温度	2-8℃

表 2. Ni NTA Magarose Beads 试剂耐受情况

试剂种类	浓度
还原剂	5 mM DTE
	1 mM DTT
	20 mM β-mercaptoethanol
	5 mM TCEP
	10 mM reduced glutathione
变性剂	8 M urea
	6 M Gua-HCl
去污剂	2% Triton™ X-100 (nonionic)
	2% Tween™ 20 (nonionic)
	2% NP-40 (nonionic)
	2% cholate (anionic)
	1% CHAPS (zwitterionic)
其他类	500 mM imidazole
	20% ethanol
	50% glycerol
	100 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	1.5 M NaCl
	1 mM EDTA
	60 mM citrate





## 2. 注意事项

- 1) 使用本产品前, 请仔细阅读产品说明书。
- 2) 磁珠保存过程中应避免冷冻/干燥和高速离心等操作, 否则会破坏磁珠的结构, 严重影响蛋白结合能力。
- 3) 在使用磁珠前, 请温和的、充分的震荡, 使磁珠保持均匀的悬浮状态。
- 4) 使用过的磁珠重复使用时, 建议纯化同一种的蛋白, 纯化不同种蛋白时, 建议使用新的磁珠, 以避免交叉污染。

## 3. 纯化流程

### 3.1 缓冲液的准备

缓冲液可使用下列推荐缓冲液, 也可根据自己的使用习惯配置不同的缓冲液体系, 基本原理就是低咪唑上样, 高咪唑洗脱, 或者高 pH 上样, 低 pH 洗脱。缓冲液在使用前最好用 0.22  $\mu\text{m}$  或者 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌。因为 **Ni NTA Magarose Beads** 可以用于可溶蛋白和包涵体蛋白的纯化, 两种方法所需缓冲液不同, 具体配置方法见表 3、表 4 和表 5。

表 3. 可溶性组氨酸标签蛋白纯化所需缓冲液及配方

名称	体积	配方
Lysis Buffer	1 L	50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (7.80 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 300 mM NaCl (17.54 g NaCl) 10 mM imidazole (0.68 g imidazole) 使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0, 使用 0.22 或者 0.45 $\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌。
Wash Buffer	1 L	50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (7.80 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 300 mM NaCl (17.54 g NaCl) 20 mM imidazole (1.36 g imidazole) 使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0, 使用 0.22 或者 0.45 $\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌。
Elution Buffer	1 L	50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (7.80 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 300 mM NaCl (17.54 g NaCl) 250 mM imidazole (17.0 g imidazole) 使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0, 使用 0.22 或者 0.45 $\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌。

上述缓冲液体系适用于多数组氨酸标签蛋白的纯化, 在 Lysis Buffer 中添加一定浓度的咪唑可以降低非特异性结合, 提高目的蛋白的纯度。初次使用的客户, 可以采用推荐的缓冲液, 再根据实验结果进行调整缓冲液中的咪唑的浓度。

表 4. 包涵体组氨酸标签蛋白纯化所需缓冲液及配方, pH 洗脱方式

名称	体积	配方
Lysis Buffer	1 L	8 M Urea (480.50 g urea) 100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (13.80 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 100 mM Tris-Cl (12.10 g Tris-Cl) 使用盐酸溶液调节 pH 至 8.0, 使用 0.22 或者 0.45 $\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌。
Wash Buffer	1 L	8 M Urea (480.50 g urea ) 100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (13.80 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 100 mM Tris-Cl (12.10 g Tris-Cl) 使用盐酸溶液调节 pH 至 6.3, 使用 0.22 或者 0.45 $\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌。
Elution Buffer	1 L	8 M Urea (480.50 g urea) 100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (13.80 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 100 mM Tris-Cl (12.10 g Tris-Cl) 使用盐酸溶液调节 pH 至 4.5, 使用 0.22 或者 0.45 $\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌。

表 5. 包涵体组氨酸标签蛋白纯化所需缓冲液及配方, 咪唑洗脱方式

名称	体积	配方
Lysis Buffer	1 L	8 M Urea (480.50 g urea) 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (7.80 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 300 mM NaCl (17.54 g NaCl) 10 mM imidazole (0.68 g imidazole) 使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0, 使用 0.22 或者 0.45 $\mu\text{m}$ 滤膜过滤。





表 5. 包涵体组氨酸标签蛋白纯化所需缓冲液及配方, 咪唑洗脱方式 (续表)

名称	体积	配方
Wash Buffer	1 L	8 M Urea (480.50 g urea ) 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (7.80 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O) 300 mM NaCl (17.54 g NaCl) 20 mM imidazole (1.36 g imidazole) 使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0, 使用 0.22 或者 0.45 μm 滤膜过滤。
Elution Buffer	1 L	8 M Urea (480.50 g urea) 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (7.80 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O) 300 mM NaCl (17.54 g NaCl) 250 mM imidazole (17.0 g imidazole) 使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0, 使用 0.22 或者 0.45 μm 滤膜过滤。

### 3.2 样品准备

#### 3.2.1 细菌或酵母表达的蛋白

- 1) 挑取单菌落到培养基中, 根据载体使用说明, 加入相应浓度的诱导剂诱导相应的时间。
- 2) 表达结束后, 将培养液转移到离心杯中, 7,000 rpm(7,500×g), 离心 15 min 收集菌体, 然后按照菌体: Lysis Buffer=1: 10 (W/V) 加入 Lysis Buffer, 加入终浓度为 1 mM 的 PMSF。加入溶菌酶 (工作浓度为 0.2-0.4 mg/ml, 如果表达的宿主细胞内含 pLysS 或 pLysE, 可以不加溶菌酶), (同时也可加入其他蛋白酶抑制剂, 但不能影响目的蛋白与填料的结合)。
- 3) 将菌体沉淀悬浮起来, (如果菌液浓度高, 也可考虑加入 10 μg/ml RNase A 和 5 μg/ml DNase I), 混匀, 放置于冰上, 然后冰上超声破碎细胞, 至菌液基本保持澄清。
- 4) 将澄清的破碎液转移至离心管中, 10,000rpm(15,000×g), 4℃离心 20-30 min。取上清, 置于冰上备用或-20℃保存。

#### 3.2.2 酵母、昆虫和哺乳细胞分泌表达可溶性蛋白

- 1) 将细胞培养液转移至离心杯, 5,000 rpm(3,800×g), 离心 10 min, 收集菌体得上清, 如上清中不含 EDTA、组氨酸和还原剂等物质, 即可直接加入柱子使用; 如含有 EDTA、组氨酸和还原剂等物质, 需用 Lysis Buffer 透析才能加入柱子。
- 2) 对于大量体积的上清, 需加入硫酸铵沉淀浓缩后, 蛋白还需用 Lysis Buffer 透析后才能加入柱子。

#### 3.2.3 包涵体蛋白纯化 (变性条件)

- 1) 将培养液转移到离心杯中, 7,000 rpm(7,500×g), 离心 15 min 收集菌体, 去掉上清。
- 2) 按照菌体: Lysis buffer (不含 8M 尿素) =1:10(W/V)将菌体悬浮起来, 混匀, 冰浴超声破碎。
- 3) 将破碎液转移至离心管中, 10,000 rpm(15,000×g), 4℃离心 20-30 min。去掉上清, 步骤 2 和 3 可以重复一次。
- 4) 按照菌体: Lysis buffer (含 8 M 尿素) =1:10(W/V)将包涵体悬浮起来。
- 5) 变性条件下进行 His 标签蛋白纯化, 具体缓冲液配方见表 4 或表 5。

### 3.3 样品纯化

- 1) **磁珠准备** 将 Ni NTA Magarose Beads 充分混匀, 使用移液器取适量的磁珠悬浮液, 置于离心管中, 将离心管置于磁分离器上, 待溶液变澄清后, 用移液器吸弃清液。
- 2) **磁珠平衡** 再将离心管磁分离器上取下来, 加入与悬浮液等体积的 Lysis Buffer, 使用枪头反复吹打 5-10 次, 将离心管置于磁分离器上, 待溶液变澄清后, 用移液器吸弃清液, 重复洗涤 2 次。
- 3) **磁珠结合目的蛋白** 将破碎液加入到处理好的磁珠中, 颠倒混匀。将离心管置于混合仪上, 室温孵育 30 min (如果目标蛋白不稳定, 建议置于 2-8℃下孵育 1 h)。
- 4) **洗杂** 将离心管置于磁分离器, 待溶液变澄清后, 用移液器移出上清液, 保留, 以备取样检测。向离心管中加入 2 倍悬浮液体积的 Wash Buffer, 使用枪头反复吹打 5-10 次, 将离心管置于磁分离器上, 待溶液变澄清后, 用移液器吸取上清液, 保留, 以备取样检测。重复上述步骤 2 次。
- 5) **洗脱目标蛋白** 可以根据需要改变洗脱体积从而达到调整目标蛋白浓度的目的。建议将 3-5 倍磁珠体积的 Elution Buffer 加入到离心管中, 使用移液器轻轻吹打 3-5 次, 混匀, 将离心管置于磁分离器上, 待溶液变澄清后, 用移液器吸取上清液, 即为目的蛋白组分。如有需要, 可以重复上述步骤 1 次, 以提高目的蛋白的回收量。
- 6) **磁珠后处理** 向装有磁珠的离心管中加入 1 ml Elution Buffer, 用移液器反复吹打 3-5 次, 使磁珠充分悬浮, 然后, 置于磁分离器, 吸弃上清, 重复该操作 2 次。再向该离心管中加入 1 ml 去离子水, 用移液器反复吹打 3-5 次, 使磁珠充分悬浮, 然后置于磁分离器, 吸弃上清, 重复该操作 2 次。最后, 加入含 20%乙醇的 1XPBS, 使总体积等于初始磁珠悬浮液的体积, 保存于 2-8℃。

### 3.4 SDS-PAGE 检测

将使用纯化产品得到的样品 (包括流出组分、洗杂组分和洗脱组分) 以及原始样品使用 SDS-PAGE 检测纯化效果。





#### 4.订购信息及相关产品

名称	货号	规格
Ni IDA Magarose Beads	SM001001	1 ml
	SM001005	5 ml
	SM001025	25 ml
	SM001100	100 ml
	SM00101L	1 L
Ni NTA Magarose Beads	SM008001	1 ml
	SM008005	5 ml
	SM008025	25 ml
	SM008100	100 ml
	SM00801L	1 L
Ni Smart Magarose Beads	SM025001	1 ml
	SM025005	5 ml
	SM025025	25 ml
	SM025100	100 ml
	SM02501L	1 L

