



Ni IDA Magarose Beads

目录

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

1. 产品介绍

Ni IDA 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 IDA 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 IDA Magarose Beads 可以用于各种表达来源（如大肠杆菌、酵母、昆虫细胞和哺乳动物细胞）的组氨酸标签（6xHis-tagged）蛋白的纯化。它是以磁性琼脂糖凝胶微球为基础，通过化学方法偶联了三配位的亚氨基二乙酸（IDA），螯合镍离子（Ni²⁺）后，可以形成比较稳定的骨架结构，从而有更多的位点与组氨酸标签上的咪唑环继续配位，达到结合目的蛋白的效果（产品化学结构见图 1 所示）。但是，这样的结构比较容易受到其他小分子的进攻，镍离子易被还原或者被螯合，从而破坏其化学结构，无法结合目的蛋白。

Ni IDA Magarose Beads 具有载量高，性价比高的优点。具体性能见表 1。

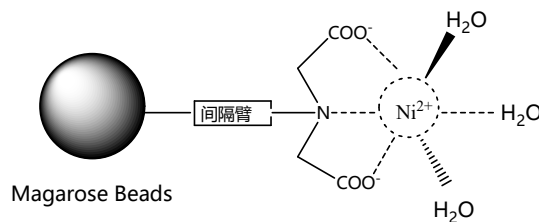


图 1. Ni IDA Magarose Beads 产品化学结构示意图

表 1. Ni IDA Magarose Beads 产品性能

项目	性能
基质	磁性琼脂糖微球
载量	> 40 mg 6xHis-tagged protein/ml 磁珠
磁珠粒径范围	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 °C

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。缓冲液在使用前最好用 0.22 μm 或者 0.45 μm 滤膜过滤除菌。具体配置方法见表 2。





表 2. 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 NaH ₂ PO ₄ (7.80 g NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ 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 μm 滤膜过滤除菌。
Wash Buffer	1 L	50 mM NaH ₂ PO ₄ (7.80 g NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ 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 滤膜过滤除菌。
Elution Buffer	1 L	50 mM NaH ₂ PO ₄ (7.80 g NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ 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。

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, 10,000 rpm(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。

3.3 样品纯化

- 1) **磁珠准备** 将 Ni IDA 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, 用移液器吸弃上清液。
- 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** 将准备好的样品 (步骤 3.2) 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 以上 (如果目标蛋白不稳定, 建议置于 2-8℃下孵育 1 h 以上)。
- 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 1×PBS, 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

