



Nickle-NTA Magarose Beads

金属镍琼脂糖磁珠（NTA）

版本号：V220101

货号：G107

保存：4°C，切勿冻结！

运输：常温

货号	规格
G107-01	10 ml

【产品概述】

本产品是以 4% 琼脂糖凝胶为基质，Ni-NTA 为配基的新型磁性微球产品，可高效快速纯化组氨酸（His-tag）标签蛋白。本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。磁珠的载量因蛋白不同而有所差异，一般每 ml 磁珠可结合 >10 mg 组氨酸标签蛋白。与传统的柱层析方法相比，Nickle-NTA Magarose Beads 具有简单快捷、高通量、自动化的蛋白纯化等优势。

【产品组分】

组分	规格
Nickle-NTA Magarose Beads	10 ml

缓冲液成分：20% 的乙醇。磁珠悬浮于保护液中，含量为 50% (V/V)。

【保存条件】

4°C 保存，保质期 24 个月；**切勿冻结！**

【注意事项】

1. 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。
2. 在使用磁珠前，请温和且充分的震荡，使磁珠保持均匀的悬浮状态。
3. 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。

【使用方法】

1. 纯化 Buffer 的配置（举例）

纯化 Buffer 可根据自己的使用习惯配置不同的缓冲液体系，也可使用下面推荐的 Buffer。基本原理为咪唑上样，高咪唑洗脱，或高 pH 上样，低 pH 洗脱。Buffer 在使用前最好用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤除菌。本产品可用于可溶蛋白和包涵体蛋白的纯化，两种方法所需 Buffer 不同，具体配置方法见表 1 和表 2。

表 1. 可溶性组氨酸标签蛋白纯化所需缓冲液及配方

名称	配液量	配方
Binding Buffer	1 L	50 mM NaH ₂ PO ₄ (6.9 g NaH ₂ PO ₄ ·H 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 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤除菌。
Wash Buffer	1 L	50 mM NaH ₂ PO ₄ (6.9 g NaH ₂ PO ₄ ·H 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 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤除菌。



Elution Buffer	1 L	50 mM NaH ₂ PO ₄ (6.9 g NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O) 300 mM NaCl (17.54 g NaCl) 250 mM imidazole (17 g imidazole) 使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0, 使用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤除菌。
----------------	-----	--

表 2. 包涵体组氨酸标签蛋白纯化所需缓冲液及配方

名称	配液量	配方
Binding Buffer	1 L	8 M Urea (480.5 g Urea) 100 mM NaH ₂ PO ₄ (13.8 g NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O) 100 mM Tris·Cl (12.1 g Tris·Cl) 使用盐酸溶液调节 pH 至 8.0, 使用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤除菌。
Wash Buffer	1 L	8 M Urea (480.5 g Urea) 100 mM NaH ₂ PO ₄ (13.8 g NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O) 100 mM Tris·Cl (12.1 g Tris·Cl) 使用盐酸溶液调节 pH 至 6.3, 使用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤除菌。
Elution Buffer	1 L	8 M Urea (480.5 g urea) 100 mM NaH ₂ PO ₄ (13.8 g NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O) 100 mM Tris·Cl (12.1 g Tris·Cl) 使用盐酸溶液调节 pH 至 4.5, 使用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤除菌

2. 样品准备

A. 细菌或酵母表达的蛋白

- 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。
- 表达结束后，将培养液转移到离心杯中，7,000 rpm，离心 15 min 收集菌体，然后按照菌体:Binding buffer=1:10(W/V)加入 Binding Buffer 重悬菌体沉淀，Binding buffer 中预先加入 PMSF，最终浓度为 1 mM。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树脂的结合）。
- 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。
- 将澄清的破碎液转移至离心管中，15,000 rpm 下，4℃离心 20-30 min。取上清，置于冰上备用或 -20℃保存。

B. 酵母、昆虫和哺乳动物细胞分泌表达可溶性蛋白

- 将细胞培养液转移至离心杯，5,000 rpm 下，离心 10 min 使菌体/细胞沉淀，弃沉淀并收集上清，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 1×PBS 4℃下透析才能加入柱子。
- 对于大量体积的上清，加入硫酸铵沉淀浓缩后，蛋白还需用 1×PBS 4℃透析后才能使用。

C. 包涵体蛋白纯化（变性条件）

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



3. 样品纯化

1) 磁珠准备

将 Nickle-NTA Magarose Beads 充分混匀，使用移液器取 200 μ l 的磁珠悬浮液，（磁珠体积 100 μ l）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 500 μ l 的 Binding 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 $^{\circ}$ C 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 1 ml 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。重复本步骤 3 次以上。

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 200-300 μ l 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，可以重复本步骤 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 200 μ l 含 20% 的乙醇的 PBS 溶液，使总体积等于初始磁珠悬浮液的体积，保存于 2-8 $^{\circ}$ C。

4. SDS-PAGE 检测

将使用纯化产品得到的样品以及原始样品使用 SDS-PAGE 检测纯化效果。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任仅限于此产品的价值本身。