



# Ni-IDA 琼脂糖磁珠

## 产品信息:

货号	规格
PA303-01	1ml

## 产品介绍:

Ni-IDA 琼脂糖磁珠可用于简单、快速地小量提取组氨酸标签蛋白。磁珠与表达组氨酸标签蛋白的细胞裂解液混合，使用磁分离方法，通过结合、洗涤和洗脱等步骤就可以纯化出目的蛋白。与传统层析方式使用的金属螯合琼脂糖柱材相比，采用磁珠纯化组氨酸标签蛋白，无需控制流速。无需昂贵的层析设备。样品与磁珠的特异性结合、洗涤以及目标蛋白的洗脱变得简单、快速、易操作。在一小时内便能获得高纯度的目标蛋白，且能轻松实现高通量和大规模样品的平行处理。

## 磁珠特点:

Ni-IDA 磁珠颗粒直径	30-150 $\mu$ m , 6%交联琼脂糖磁珠
金属离子密度	30-50 $\mu$ mol/ml 磁珠
蛋白结合量	>30 mg 6His-EGFP /ml (100%磁珠)
工作温度	2-30 $^{\circ}$ C
悬液浓度	25% (v/v) 磁珠悬液
保存液	20% (v/v) 乙醇
保质期	2-8 $^{\circ}$ C可稳定保存, 保质期两年

**自备器材和试剂:** 磁力架, 带组氨酸标签的重组蛋白, 缓冲液, 摇床或旋转混合仪。

**适用范围:** 用于纯化细菌、酵母、昆虫和哺乳动物细胞等系统表达的可溶性组氨酸标签蛋白, 也可用于变性蛋白的纯化(包涵体蛋白需在变性条件下进行)。

## 蛋白表达分析及缓冲液的准备:

蛋白纯化前, 首先需要确定重组蛋白的表达方式, 是可溶性还是包涵体表达。不同的表达方法采用不同的缓冲液进行纯化。

咪唑梯度浓度洗脱是组氨酸标签蛋白常用洗脱方法。纯化新的蛋白质时, 在不确定最佳的咪唑洗脱浓度的情况下, 推荐在缓冲液中分别加入 10 mM、20 mM、50 mM、100 mM、200 mM、300 mM、400 mM、500 mM 咪唑, 浓度从低到高分别洗脱, 磁吸后收集蛋白上清液, 通过 SDS-PAGE 电泳等方法鉴定洗脱效果。目标蛋白与组氨酸标签蛋白纯化磁珠的结合性能将直接影响目标蛋白的纯化效率, 而各种缓冲液配制也将在一定程度上影响目标蛋白的回收率和纯度。因此, 在较大规模蛋白纯化之前, 用户应该自行设计实验, 筛选出适合纯化目标蛋白的缓冲液体系。

## 可溶性表达蛋白的缓冲液:

Binding Buffer: 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 0-10 mM imidazole, 0.05% Tritonx-100, pH 8.0

Wash Buffer: 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10-80mM imidazole, 0.05% Tritonx-100, pH 8.0

Elution Buffer: 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 300-500 mM imidazole, pH 8.0

(在 Binding buffer 和 Wash buffer 中一定要加入 0.05%的 Triton X-100 或 Tween 20, 降低塑料壁对磁珠的吸附。)

## 包涵体表达蛋白的缓冲液

当 Ni-IDA 磁珠用于纯化组氨酸标签的包涵体蛋白时，纯化 Buffer 中都需要含有一定浓度的尿素（4-8M 的 Urea）。尿素浓度应该与起始样品中的浓度保持一致。

采用 5M 盐酸胍作为蛋白变性剂时，洗脱后的含盐酸胍的样本需在 6-8M 尿素中透析掉盐酸胍再进行电泳。

## 操作步骤：

这个方法可以纯化 0.5mg 左右的可溶性组氨酸标签蛋白，如果需要大量纯化，需按比例调整磁珠和溶液的使用量。最后洗脱得到的蛋白量与每种蛋白的大小和表达量有关。

1. 将装有磁珠的试剂瓶充分混匀。吸取 100ul 混匀好的磁珠到一个 1.5ml 的离心管中。
2. 加入 400ul 的 Binding Buffer，颠倒混匀 10 秒钟。
3. 将离心管置于磁力架上，静止 10 秒钟，然后转动一下离心管，静止 30 秒钟，磁珠都被吸附到磁铁的一侧，小心吸掉上清。
4. 加入 500ul 的 Binding Buffer，颠倒混匀 10 秒钟。将离心管置于磁力架上，静止 10 秒钟，然后转动一下离心管，静止 30 秒钟，磁珠都被吸附到磁铁的一侧，小心吸掉上清。
5. 将 500ul 离心处理好的含组氨酸标签蛋白的样本和 500ul Binding Buffer 等体积混匀（留 50ul 样本用于 SDS-PAGE 分析）。
6. 将第 5 步中准备好的样本加入到含有清洗好珠子的 1.5 ml 离心管中。颠倒混匀，在摇床上晃动 20-30 分钟。
7. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠，小心倒掉上清。（如有必要可以保留上清，此为流穿样品，用于 SDS-PAGE 分析。）
8. 加入 500ul 的 Wash Buffer，颠倒混匀 10 秒钟。用磁力架收集磁珠。倒掉上清。（如有必要可以保留上清，此为洗涤样本，用于 SDS-PAGE 分析。）
9. 加入 500ul 的 Wash Buffer。重复步骤 8。
10. 加入 100ul 的 Elution Buffer。室温放置 2 分钟洗脱蛋白。
11. 用磁力架收集磁珠。小心吸取液体，此液体中含有纯化好的目的表达蛋白。
12. 可加入 100ul 的 Elution Buffer。重复步骤 10-11，再次收集从磁珠上洗脱下来的目的蛋白。
13. 用 SDS-PAGE 方法对样本进行蛋白纯度分析，用 Bradford 或 BCA 蛋白定量分析蛋白的浓度。

## 纯化后的磁珠处理

1. 往装有磁珠的 1.5ml 离心管中加入 500ul Elution Buffer，颠倒混匀离心管数次，充分悬浮磁珠，磁性分离，去除上清液。重复该步骤两次。去掉上清液。
2. 往离心管中加入 1ml 蒸馏水，颠倒混匀离心管数次，悬浮磁珠，磁性分离去除上清液，重复该步骤两次。
3. 加入 20% (v/v) 乙醇到磁珠中使总体积为 100ul，保存于 2~30℃（长期保存，置于 2~8℃），可用于下一次同种蛋白的纯化。

## 蛋白纯化步骤优化

以上操作流程适用于大部分组氨酸标签蛋白的纯化。根据目标蛋白与磁珠的结合程度，适当改变条件，优化蛋白纯化步骤：

1. 适当降低样品溶液和 Binding/Wash Buffer 中的 Imidazole 浓度。
2. 在样品溶液和其它缓冲液中添加表面活性剂等物质。
3. 添加合适的蛋白酶抑制剂，防止目标蛋白降解。
4. 适当增加磁珠用量。
5. 延长蛋白与磁珠的孵育时间。
6. 延长洗脱目标蛋白的时间或增加洗脱次数。
7. 适当提高样品溶液和 Binding/Wash Buffer 中的 Imidazole 和 NaCl 浓度。

## 磁珠再生步骤

Ni-IDA 琼脂糖磁珠连续使用 6-8 次后，结合组氨酸标签蛋白的能力会降低，建议进行磁珠再生处理，Ni-IDA 琼脂糖磁珠的再生需下列缓冲液：

Stripping Buffer: 50mM Tris-HCl, 150mM EDTA pH=8.0

Beads Wash Buffer: 0.5M NaOH, 2M NaCl

Recharge Buffer: 100mM NiSO<sub>4</sub> 溶液

Storage Buffer: 20% (v/v) 乙醇。

- 1.将 Ni IDA 琼脂糖磁珠悬浮液磁性分离去除上清液；
- 2.加入 1mL Stripping Buffer, 充分混匀磁珠, 室温旋转混合 10min, 磁性分离去除上清液, 重复此步骤 1 次；
- 3.加入 1mL 去离子水, 充分混匀磁珠, 磁性分离去除上清液；
- 4.加入 1mL Beads Wash Buffer, 充分混匀磁珠, 室温旋转混合 10min, 磁性分离去除上清液, 去离子水重复洗涤 3-5 次, 至洗涤液呈中性为止；
- 5.加入 1mL Recharge Buffer, 充分混匀磁珠, 室温旋转混合 30~60min; 磁性分离去除上清液, 去离子水重复洗涤 5 次以上, 磁珠再生完毕。

**注:** 以上再生的磁珠可直接用于 His 标签蛋白的纯化, 或分散于超纯水中短期保存, 长期保存建议分散到 20%(v/v)乙醇溶液, 置于 2-8℃ 保存。

#### 注意事项:

- 1.磁珠与蛋白结合量与目标蛋白特性以及在细胞中的表达量相关。
- 2.固形物浓度 25% (v/v)是指 100μl 磁珠悬浮液中包含 25μl 体积的磁珠。
- 3.产品可配合磁珠提取仪实现高通量工作。
- 4.在使用和保存过程中, 磁珠不可以干燥和冷冻。
- 5.本产品可重复使用 6-8 次, 当纯化性能降低时, 建议进行磁珠再生处理。

BM20180918