

使用说明书

【产品名称】 Ni NTA 琼脂糖磁珠

【产品型号】 MAg25K/NTA Ni

【目录号】 P41

【产品介绍】

Enriching Beads® Ni NTA 琼脂糖磁珠是专为组氨酸标签(His-tag)蛋白纯化而设计的新型功能化材料。与传统的金属螯合琼脂糖或者葡聚糖预装柱相比，Ni NTA 琼脂糖磁珠具有顺磁性，借助外加磁场易实现目标蛋白的分离与纯化；操作简单，一步纯化即可获得高纯度的组氨酸标签蛋白；可通过洗脱液体积控制目标蛋白浓度，方便后续样品处理，Ni 磁珠可简单再生、重复使用。Ni NTA 琼脂糖磁珠适合原核细胞（如大肠杆菌）表达的可溶性或者以包涵体形式存在的组氨酸标签蛋白的纯化。

【产品规格】

平均粒径	25µm
螯合金属离子	Ni ²⁺
金属离子密度	40~60µmol/mL(100%,v/v)
固形物浓度	10% (v/v)
分散液	H ₂ O
目标蛋白结合量	20mg of protein/mL beads(100%,v/v)

【产品特点】

- ◇ 结合载量高；
- ◇ 非特异性吸附低。

【作用对象】 细菌，酵母，昆虫和哺乳动物细胞等分泌或胞内表达的组氨酸标签蛋白。

【保存条件】 去离子水，长期保存建议 20%乙醇，2℃~8℃，请勿冻融使用。

【备注信息】

- 1: 磁珠与蛋白结合量与目标蛋白特性有关，此处仅作参考值；
- 2: 固形物浓度 10% (v/v)是指 1mL 磁珠悬浮液中包含 100µL 体积的磁珠；
- 3: 产品可配合英芮诚 ETP-300 型核酸提取仪实现高通量工作；
- 4: 磁珠使用和保存过程中应避免反复冻融，且不可以干燥；
- 5: 用户可进一步检测经 Ni NTA 琼脂糖磁珠纯化、磁场分离后的组氨酸标签蛋白上清液，优化蛋白纯化流程；
- 6: 本产品可重复使用 8~10 次，当纯化性能降低时，建议进行再生处理；

7: 使用过的磁珠重复使用时，建议纯化同种蛋白，纯化不同种类蛋白时，建议使用新的磁珠。

【实验参考】

表一：粗蛋白样本，Wash Buffer，Elution Buffer使用推荐比例

粗蛋白样本	Wash Buffer	Elution Buffer 1	Elution Buffer 2
1mL	500~1000 μ L	200~400 μ L	100~200 μ L

表二：Ni磁珠与蛋白结合能力

Ni磁珠使用量	50uL（建议最低使用量）	500uL	1000uL
蛋白结合量	75~150 μ g protein	750~1500 μ g protein	1500~3000 μ g protein

注：需要破碎菌体质量/体积根据所使用的表达体系和组氨酸标签蛋白的表达水平来决定，Ni磁珠与不同的组氨酸标签蛋白的结合量略有不同，参考表1和表2使用Ni磁珠。

【操作流程】

1. 实验准备

1.1 离心管，磁力架，旋转混合仪或涡旋混合仪；

1.2 缓冲液的准备：

目标蛋白与 Ni NTA 琼脂糖磁珠的结合性能将直接影响目标蛋白的纯化效率，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，主要包括 Binding Buffer、Wash Buffer、Elution Buffer。

Binding Buffer: 20mM Sodium Phosphate, 500mM NaCl, 0~20mM Imidazole, pH7.4

Wash Buffer: 20mM Sodium Phosphate, 500mM NaCl, 0~40mM Imidazole, pH7.4

Elution Buffer: 20mM Sodium Phosphate, 500mM NaCl, 400mM Imidazole, pH7.4

注 1: Wash Buffer 中的 Imidazole 浓度推荐先用 10~30mM 进行尝试

2. 样品处理

2.1 高速离心收集大肠杆菌、酵母或细胞等；

2.2 向上述的细胞沉淀中加入适量体积的 Binding Buffer，以及蛋白酶抑制剂（如终浓度为 1mM 的 PMSF），重悬细胞，冰浴超声或者高压破碎裂解细胞，即为粗蛋白样品。

3. 磁珠预处理

3.1 将 Ni IDA 琼脂糖磁珠悬浮液充分混匀，移取所需量到离心管中，磁性分离去除上清液；

3.2 加入去离子水，充分混匀磁珠，磁性分离去除上清液（1次）；

3.3 加入 Binding Buffer，充分混匀磁珠，磁性分离去除上清液（1次）。

4. 目标蛋白纯化

4.1 将步骤 2（样品处理）得到的粗蛋白样品加入含预处理过磁珠的离心管中，将离心管放置于旋转混合仪上，室温旋转孵育 30min；

4.2 磁性分离去除上清液或保留上清液以备后续检测；

4.3 加入 Wash Buffer，反复颠倒离心管 1min 使磁珠重悬，磁性分离，保留磁珠，弃上清液或保留上清液以备后续检测；

4.4 重复 4.3 步骤 2~3 次。

注：1、如果目标蛋白含量较低或者结合能力较弱，建议延长磁珠与 His 标签蛋白的孵育时间；

2、如果目标蛋白易降解，可以在 2~8℃ 的低温环境下孵育，孵育时间请延长至 1h 以上；

5. 目标蛋白洗脱

5.1 加入适量 Elution Buffer，充分混匀磁珠，洗脱 5~10min，置于旋转混合仪上旋转 10min 以上效果更佳，用户可根据需要改变洗脱体积，调整目标蛋白浓度；

5.2 磁性分离，收集洗脱液到新的离心管中，得到纯化的目标蛋白；

5.3 加入适量 Elution Buffer 进行第二次洗脱。

6. 磁珠后处理

6.1 在装有磁珠的离心管中加入 Elution Buffer，充分混匀磁珠，磁性分离去除上清液，重复 2~3 次；

6.2 加入 1 mL 去离子水，充分混匀磁珠，磁性分离去除上清液，重复 2~3 次；

6.3 清洗完毕的磁珠可直接用于下一次同种蛋白的纯化，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。

7. 磁珠再生

Ni NTA 琼脂糖磁珠连续使用 8~10 次后，结合目标蛋白的能力可能会明显降低，建议进行磁珠再生处理，Ni NTA 琼脂糖磁珠的再生需要先自行配置下列缓冲液：

Stripping Buffer: 50mM Tris-HCl、150mM EDTA 的 PBS 溶液，pH=7.2~7.6；

Beads Wash Buffer: 0.5M NaOH，2M NaCl，去离子水溶液；

Recharge Buffer: 100~200mM NiSO₄ 溶液；

Storage Buffer: 20%(v/v)乙醇。

7.1 将 Ni NTA 琼脂糖磁珠悬浮液磁性分离去除上清液；

7.2 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；

7.3 加入 1mL 去离子水，充分混匀磁珠，磁性分离去除上清液；

7.4 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；

7.5 加入 1mL Recharge Buffer，充分混匀磁珠，室温旋转混合 30~60 min；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。

【蛋白纯化流程的优化】

以上操作流程适用于大部分组氨酸标签蛋白的纯化，根据目标蛋白与金属离子螯合磁珠的结合性能不同，用户可以从以下几个方面对纯化流程进行优化，以提高目标蛋白的回收率和纯度。

提高目标蛋白回收率的参考方法

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。

提高目标蛋白纯度的参考方法

1. 适当提高样品溶液和 Binding/Wash Buffer 中的 Imidazole 和 NaCl 浓度；
2. 样品和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. 延长清洗时间，增加清洗次数；
5. 采用梯度 Imidazole 浓度洗脱目标蛋白。

【其它】

该产品可配合英芮诚核酸提取仪（订货号 ETP-300）进行自动化操作，也可以配合多功能磁力架（订货号 CQT-0011）、16 位磁力架（订货号 CQT-0001）、手动磁性萃取指套（订货号 CQT-0008）进行手动操作。

【注意事项】

1. 首次使用本产品前，请务必详细阅读本用户手册；
2. 磁珠使用和保存过程中应避免冷冻、干燥和高速离心等操作；
3. 在使用本产品前，请务必充分振荡使磁珠保持均匀的悬浮状态；
4. 请选用质量好的移液器吸头和离心管，以免磁珠贴壁或混合过程中发生渗漏引起磁珠的损耗；
5. 磁珠与溶液混合过程中，如果溶液粘稠无法通过翻转离心管重悬磁珠，可采用移液器反复吹打或短时涡旋混合使磁珠充分重悬；
6. 用户可根据实际需要保留经磁性分离移去的上清液，进行取样检测，以便分析纯化过程和优化蛋白纯化流程；
7. 本产品可以重复使用，当纯化性能降低时，建议进行再生处理；
8. 使用过的磁珠重复使用时，建议纯化同种蛋白，纯化不同种类的蛋白时，建议使用新的磁珠；
9. 本产品需与磁性分离器配套使用；
10. 本产品在 2~8℃可稳定保存，保质期两年；
11. 本产品仅供研究使用。

附 1：Ni 磁珠溶剂耐受性表

溶剂种类	溶剂名称	可耐受浓度	备注
缓冲液试剂	HEPES	100mM	带有仲胺或叔胺的缓冲液会将 Ni 离子还原
	Tris-HCl, pH7.4	100mM	
	Tris-Acetate, pH7.4	100mM	
	MOPS	100mM	
螯合试剂	EDTA	1mM	会将 Ni 离子从磁珠上剥离
	EGTA	1mM	
巯基试剂	DTE	1mM	低浓度时会将 Ni 离子还原
	DTT	1mM	
	β -巯基乙醇	20mM	防止分子间形成二硫键，高浓度时会将 Ni 离子还原
	THP	1mM	
表面活性剂	Triton X-100	2%	
	Tween20	2%	
	NP-40	2%	
	Cholate	2%	
	CHAPS	1%	
其它添加剂	Imidazole	500mM	
	Ethanol	20%	
	NaCl	1.5M	
	Na ₂ SO ₄	100mM	
	Glycerin	50%	
	Citrate	60mM	

英芮诚生化科技（上海）有限公司

地址：上海市杨浦区翔殷路 128 号 1 号楼 B 座 301 室

电话：021-55809378

网址：www.bio-enriching.com

电子邮件：marketing@bio-enriching.com

版权声明：© 英芮诚生化科技（上海）有限公司保留本使用说明书的所有权利。版本：V.180201