

Starose Mag Ni-TED

产 品 说 明 书

Starose Mag Ni-TED 说明书

【产品简介】

Starose Mag Ni-TED 琼脂糖磁珠是一种用于纯化带有组氨酸 (His) 标签蛋白的新工具, 其具有超顺磁性, 可通过外加磁场实现快速的分离与回收。本产品的活性基团为螯合有 Ni²⁺ 的羧甲基乙二胺, 与琼脂糖外壳的强结合使 Starose Mag Ni-TED 可耐受一些导致金属离子脱落的试剂, 可用于纯化和筛选分泌到真核细胞培养基上清或其它含有一定 EDTA、DTT 等还原剂成分的组氨酸标签蛋白。

与传统的 Ni-TED 介质相比, Starose Mag Ni-TED 有以下优势:

1. 操作简单且快速;
2. 高纯度、高收率;
3. 适用于小规模样品的快速提取;
4. 稳定的平行重复实验结果;
5. 易于放大。

【性能参数】

基质	高交联琼脂糖
螯合金属离子	Ni ²⁺
金属离子密度	≥20 μmol/mL 磁珠 (100%)
磁珠浓度	25% (v / v)
粒径分布	40-100 μm
蛋白结合量	≥9 mg/mL 磁珠 (100%)
化学稳定性	常规水相缓冲液, 8 M 尿素, 6 M 盐酸胍, 1 M 氢氧化钠 (脱镍后), 50 mM EDTA, 5 mM DTT
储存条件	20%乙醇, 2-8 °C

【实验建议】

1. 常用缓冲液

Binding Buffer	20 mM Phosphate Buffer, 500 mM NaCl, 0~20 mM Imidazole, pH 7.4
Washing Buffer	20 mM Phosphate Buffer, 500 mM NaCl, 0~50 mM Imidazole, pH 7.4

Elution Buffer	20 mM Phosphate Buffer, 500 mM NaCl, 300~500 mM Imidazole, pH 7.4
Storage buffer	20%(v/v) Ethanol

缓冲液的配制影响着目标蛋白的纯度和回收率，在纯化较大规模蛋白之前，用户应自行设计相关实验，筛选出适用于当前蛋白的缓冲液体系。在结合缓冲液中添加少量咪唑可以减少杂蛋白的吸附，提升最终纯度；洗脱时，不确定最佳洗脱咪唑浓度的情况下，推荐使用不同咪唑梯度洗脱，并收集上清液做 SDS-PAGE 电泳验证，确定合适的洗脱浓度。

2. 操作流程

2.1 样品制备

取适量的表达细胞用 Binding Buffer 重悬，加入蛋白酶抑制剂（例如：终浓度为 1 mM 的 PMSF），搅拌混合均匀，冰浴超声裂解细胞，即为粗蛋白样品。

2.2 磁珠预处理

根据样品表达量，取 200 μ L（根据实际情况调整）分散均匀的磁珠悬液于 1.5 mL EP 管中，置于磁力架上，待磁珠被充分分离后，弃掉磁珠 Storage Buffer，用 500 μ L Binding Buffer 清洗磁珠 2-3 次。

2.3 目标蛋白吸附

将 1 mL 步骤 2.1 中样品加入步骤 2.2 处理后的磁珠中，在室温或 4 $^{\circ}$ C 条件下，用垂直混合仪或手动轻柔翻转 EP 管，使磁珠充分的分散在样品溶液中，30-60 min 后进行磁性分离（对于部分易降解的蛋白，建议在 2~8 $^{\circ}$ C 下孵育 1 h 以上），移出上清液，留样检测或废弃。

2.4 游离蛋白去除

在步骤 2.3 EP 管中加入 1 mL Washing Buffer，翻转重悬磁珠后进行磁性分离，移出上清液，留样检测或废弃；重复 2-3 次即可。

2.5 目标蛋白洗脱

取 100-500 μ L Elution Buffer 加入 EP 管中，在室温或 4 $^{\circ}$ C 条件下，用垂直混合仪或手动轻柔翻转 EP 管，使磁珠充分的分散，10 min 后进行磁性分离，移取上清液至新 EP 管；重复 1-2 次，取磁分离后清液。

注：建议用户在第一次洗脱后再重复洗脱 1-2 次，确保目的蛋白充分回收；磁珠上 90% 的结合蛋白在第一次洗脱时会被洗脱。因此，之后的洗脱时间及洗脱液体积均可自定义，翻转混合均匀后磁性分离即可。

2.6 磁珠后处理

使用后的磁珠用 1 mL Elution Buffer 洗涤 2 次，磁性分离后移除上清液；之后用去离子水洗涤 2 次，磁性分离后移除上清液；加入 Storage Buffer 使磁珠浓度为 25% (v/v)，置于 2-8 °C 保存。

3. 磁珠再生

Starose Mag Ni-TED 琼脂糖磁珠在连续使用 8~10 次后，若出现载量明显下降的现象时，表明螯合的 Ni²⁺有部分脱落，建议进行再生处理，需准备以下缓冲液：

Stripping Buffer	20 mM Phosphate Buffer, 500 mM NaCl, 100 mM EDTA, pH7.4
Beads Washing Buffer 1	0.5 M NaOH
Beads Washing Buffer 2	20 mM Phosphate Buffer, 500 mM NaCl, pH 7.4
Recharge Buffer	100 mM NiSO ₄
Storage Buffer	20% Ethanol

具体操作流程如下：

(1) 取 100 μL 结合性能降低的磁珠至 1.5 mL EP 管中，磁性分离移除上清液，加入 500 μL Stripping Buffer，重悬磁珠，在 37°C 摇床内震荡混合 30 min，磁性分离，去除上清液，重复 1 次；

(2) 加入 1 mL 去离子水，手动翻转 EP 管使磁珠重悬，磁性分离后移除清液，重复 2 次；

(3) 加入 500 μL Beads Washing Buffer 1，在室温下使用垂直混合仪或手动轻柔翻转 EP 管，使磁珠重悬，5 min 后磁性分离移除清液；加入 1 mL Beads Washing Buffer 2，手动翻转 EP 管使磁珠重悬，磁性分离后移除上清液，重复 3~5 次，至洗涤液呈中性为止；

(4) 加入 100 μL Recharge Buffer，在室温下使用垂直混合仪或手动轻柔翻转 EP 管，使磁珠重悬，5 min 后磁性分离移除上清液，重复 2 次；用 Beads Washing Buffer 2 洗涤磁珠 5 次以上，确保游离的 Ni²⁺去除完全；

(5) 加入 1 mL Storage buffer 清洗磁珠，手动翻转 EP 管使磁珠重悬，磁性分离后移除清液，重复 3 次，最终用 100 μL Storage buffer 保存磁珠（磁珠浓度为 10% (v/v)，置于 2-8°C 保存。

【注意事项】

1. 磁珠应保存在储存溶液中，请勿离心、干燥或冷冻磁珠，因此产生的磁珠聚集会严重影响产品的性能；
2. 建议磁珠仅重复纯化同种蛋白，当纯化性能降低时，可进行再生处理；
3. 磁珠应与磁力架配套使用，在使用过程中，应保持磁珠吸附一定时间之后，再通过移液器移取上清液，避免磁珠吸附不完全导致的磁珠损耗；
4. 本产品仅供研究使用。

【常见问题及解答】

Q: 如何提高蛋白回收率?

- A: (1) 增加磁珠用量；
(2) 延长孵育时间；
(3) 增加目标蛋白洗脱时间及洗脱次数；
(4) 添加合适的蛋白酶抑制剂；
(5) 适当降低样品和 Binding/Washing Buffer 中的咪唑浓度；
(6) 在样品和缓冲液中添加适量的表面活性剂等物质；

Q: 如何提高目标蛋白纯度?

- A: (1) 改变咪唑浓度，梯度洗脱目标蛋白；
(2) 添加合适的蛋白酶抑制剂；
(3) 适当提高样品和 Binding/Washing Buffer 中的咪唑和 NaCl 浓度；
(4) 在样品和缓冲液中添加适量的表面活性剂等物质。