

Starose Mag Ni-NTA

产 品 说 明 书

Starose Mag Ni-NTA 说明书

【产品简介】

Starose Mag Ni-NTA 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整合有 Ni²⁺ 的亚硝基三乙酸。

与传统的 Ni-NTA 介质相比, Starose Mag Ni-NTA 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	≥20 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)
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

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 $^{\circ}$ C 保存。

3. 磁珠再生

Starose Mag Ni-NTA 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 μ L 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 μ L 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 μ L 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 μ L 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 μ L 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。