



# Ni Smart Magarose Beads

## 目录

1. 产品介绍.....	1
2. 注意事项.....	1
3. 纯化流程.....	1
4. 订购信息及相关产品.....	3

## 1. 产品介绍

**Ni Smart Magarose Beads** 是一种新型 IMAC 填料, 整合有非常牢固的 Ni 离子. 具体性能见表 1. **Ni Smart Magarose Beads** 主要应用于分泌到真核培养液上清中的组氨酸标记蛋白的捕获和纯化, 可以在含有 EDTA 及 DTT 的情况下进行目的蛋白高效的纯化。**Ni Smart Magarose Beads** 有很强的组分兼容性, 适用于广泛底物及盐浓度的缓冲条件, 试剂耐受情况见表 2。

**Ni Smart Magarose Beads** 是专为高效/快速纯化组氨酸标签蛋白而设计的新型磁性微球产品, 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。

与传统的柱层析方法相比, 使用 **Ni Smart Magarose Beads** 无需控制上样流速, 更不需要昂贵的层析设备和离心设备, 样品与磁珠的结合以及目的蛋白与磁珠的分离便的非常简单、快捷, 而且更容易实现高通量、自动化的蛋白纯化方法。

表 1. Ni Smart Magarose Beads 产品性能

项目	性能
基质	磁性琼脂糖微球
载量	> 10 mg 6×His-tagged protein/ml 磁珠
磁珠粒径	30-100 μm
磁珠比例	磁珠悬浮于保护液中, 含量为 20% (V/V)
保护液缓冲液	含 20%乙醇的 1×PBS
储存温度	2-8℃

表 2. Ni Smart Magarose Beads 试剂耐受情况

试剂种类	耐受时间
0.01 M NaOH	1 week
10 mM EDTA 1 M NaOH 5 mM DTT 5 mM TCEP 20 mM 巯基乙醇 6 M 盐酸胍	24 h
500 mM 咪唑 100 mM EDTA	2 h
30%异丙醇	20 min

## 2. 注意事项

- 1) 使用本产品前, 请仔细阅读产品说明书。
- 2) 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。
- 3) 在使用磁珠前, 请温和的、充分的震荡, 使磁珠保持均匀的悬浮状态。
- 4) 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。

## 3. 纯化流程

### 3.1 缓冲液的准备

缓冲液可使用下列推荐溶液, 也可根据自己的使用习惯配置不同的缓冲液体系, 基本原理就是低咪唑上样, 高咪唑洗脱, 或者高 pH 上样, 低 pH 洗脱。缓冲液在使用前最好用 0.22 μm 或者 0.45 μm 滤膜过滤除菌。因为 **Ni Smart Magarose Beads** 可以用于可溶蛋白和包涵体蛋白的纯化, 两种方法所需缓冲液不同, 具体配置方法如下:





### 可溶性组氨酸标签蛋白纯化所需缓冲液

Lysis Buffer: 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, pH 8.0

Wash Buffer: 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 0-5 mM imidazole, pH 8.0

Elution Buffer: 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0

### 包涵体组氨酸标签蛋白纯化所需缓冲液

Lysis Buffer: 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 8 M Urea, pH 8.0

Wash Buffer: 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 8 M Urea, 0-5 mM imidazole, pH 8.0

Elution Buffer: 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 8 M Urea, 250 mM imidazole, pH 8.0

**注:** 为了减少宿主细胞蛋白的洗脱, 建议在洗杂液中加入低浓度的咪唑。

为了消除一些离子作用蛋白的吸附, 可以在溶液中加入 0.5 M-1.0 M NaCl。

可以采用低 pH 值洗脱或与咪唑结合, 如 pH 2.5-5.0。

## 3.2 样品准备

### 3.2.1 细菌或酵母表达的蛋白

- 1) 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。
- 2) 表达结束后, 将培养液转移到离心杯中, 7,000 rpm(7,500×g), 离心 15 min 收集菌体, 然后按照菌体: Lysis Buffer=1: 10 (W/V) 加入 Lysis Buffer, 加入终浓度为 1 mM 的 PMSF。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填料的结合)。
- 3) 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。
- 4) 将澄清的破碎液转移至离心管中, 10,000rpm(15,000×g), 4℃离心 20-30 min。取上清, 置于冰上备用或-20℃保存。

### 3.2.2 酵母、昆虫和哺乳细胞分泌表达可溶性蛋白

- 1) 将细胞培养液转移至离心杯, 7,000 rpm (7,500×g), 离心 15 min 取上清。
  - 2) 样品中含有可耐受范围内试剂, 不需要透析或浓缩, 可以直接上样。
- 注:** 所有样品在过柱前, 可以用 0.22 μm 或者 0.45 μm 滤膜过滤, 防止柱子堵塞。

### 3.2.3 包涵体蛋白纯化 (变性条件)

- 1) 将培养液转移到离心杯中, 7,000 rpm(7,500×g), 离心 15 min 收集菌体, 去掉上清。
- 2) 按照菌体: Lysis buffer (不含 8M 尿素) =1:10(W/V)将菌体悬浮起来, 混匀, 冰浴超声破碎。
- 3) 将破碎液转移至离心管中, 10,000 rpm(15,000×g), 4℃离心 20-30 min。去掉上清, 步骤 2 和 3 可以重复一次。
- 4) 按照菌体: Lysis buffer (含 8 M 尿素) =1:10(W/V)将包涵体悬浮起来。
- 5) 变性条件下进行 His 标签蛋白纯化。

## 3.3 样品纯化

- 1) **磁珠准备** 将 Ni Smart Magarose Beads 充分混匀, 使用移液器取适量的磁珠悬浮液, 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, 加入与悬浮液等体积的平衡液, 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℃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 2 倍悬浮液体积的洗杂液, 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。重复上述步骤 2 次。
- 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 3-5 倍磁珠体积的洗脱液加入到离心管中, 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, 可以重复上述步骤 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 洗脱液, 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, 加入含 20%乙醇的 1XPBS, 使总体积等于初始磁珠悬浮液的体积, 保存于 2-8 ℃。

## 3.4 SDS-PAGE 检测

将使用纯化产品得到的样品 (包括流出组分、洗杂组分和洗脱组分) 以及原始样品使用 SDS-PAGE 检测纯化效果。





#### 4. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
Ni IDA Magarose Beads	SM001001	1 ml
	SM001005	5 ml
	SM001025	25 ml
	SM001100	100 ml
	SM00101L	1 L
Ni NTA Magarose Beads	SM008001	1 ml
	SM008005	5 ml
	SM008025	25 ml
	SM008100	100 ml
	SM00801L	1 L
Ni Smart Magarose Beads	SM025001	1 ml
	SM025005	5 ml
	SM025025	25 ml
	SM025100	100 ml
	SM02501L	1 L

