

NTA磁珠 (MSP-NTA)

产品简述

- 多个样品，适合同步平行操作
- 微米界面上结合带 6His 蛋白更快
- 需磁分离架；纯化融合蛋白仅约 1 小时
- 可选(4~50 °C 间)温度纯化融合表达蛋白
- 融合蛋白制备的规模，能轻松达到毫克级
- 可自选螯合多种离子(Ni²⁺、Co²⁺及 Cu²⁺)
- 适合真核及原核重组表达带 His-tag 融合蛋白
- 用于固定化融合蛋白 pull-down 相互作用的蛋白
- 用于固定化融合靶蛋白快速筛选混合物中高亲和力配体
- 超顺磁 Fe₃O₄ 颗粒(在外部磁场中有磁性；呈 Fe₃O₄ 颗粒褐色)
- 表面用小分子两性离子对进行多层共价修饰，含大量带电基团故强亲水
- 表面亲水修饰过程中同步生成有至少 6 原子的线性臂的羧基用于偶联 NTA
- 对水溶蛋白(无膜结合域大肠杆菌碱性磷酸酶)及疏水小分子非特异吸附可忽略
- 悬浮稳定性好、蛋白非特异吸附低、磁分离响应快；螯合带 6His 标签蛋白位阻小

性能/规格

指标/特征	性能/性状
保存液	20 mM 磷酸钠, pH 7.4, 0.09%叠氮钠, 0.1%抗氧化剂
产品形态	保存液, 混悬液
保质期	2~8 °C、不开封、避光保存; 保质期不短于 24 个月
工作温度	4~50 °C
螯合金属离子	Ni ²⁺
蛋白偶联量	≥15 mg His-tagged ECAP/g 磁珠
非特异吸附	对常见蛋白非特异吸附, 低于检测限

应用过程示例

MSP-NTA 螯合 Ni、Co²⁺或 Cu²⁺后，适合亲和纯化 6His-组氨酸标签融合表达蛋白^[1]、固定化 6His-组氨酸标签融合表达蛋白筛选互作成分^[2]。以下应用流程和缓冲液等均供参考。

结合缓冲液: 20 mM Tris-HCl, pH8.0, 300 mM NaCl, 10 mM 咪唑

洗涤缓冲液: 20 mM Tris-HCl, pH8.0, 300mM NaCl, 20 mM 咪唑

洗脱缓冲液: 20 mM Tris-HCl, pH8.0, 300mM NaCl, 500 mM 咪唑

应用过程示例 1: 带 6His 标签融合蛋白的纯化

1. 样品准备

细菌、酵母、昆虫和哺乳动物的裂解液或分泌表达可溶性蛋白培养液的上清, 加入适量的结合缓冲溶液, 即为粗蛋白样品。为获得高纯度产物, 样品中带 6His 标签蛋白丰度应不低于 5%。样品裂解液经离心或 0.22 μm 滤膜过滤预处理, 有利于提高磁珠使用后再生效力。

2. 磁珠洗涤和预处理

据预期目标蛋白的纯化量确定磁珠的用量; 纯化 1.0 mg 带 6His 标签的目标蛋白, 需磁珠悬液约 60 mg 磁珠或 30 g/L 悬液 2.0 mL。建议洗涤过程如下:

- (1) 将磁珠置于漩涡振荡器上充分混匀, 取 2.0 mL 悬浮液于 5.0 ml 的 EP 管中;
- (2) 将离心管置于磁分离架上, 磁分离, 弃上清(产品保存液中含叠氮钠, 需单独处理);
- (3) 加入 5.0 mL 结合缓冲溶液到上述装有磁珠的离心管中, 置于漩涡振荡器上充分混匀, 磁分离将磁珠吸附到试管壁, 弃上清, 备用; 按磁珠全回收计算悬液中 MSP-NTA 浓度。

3. 螯合 Ni 离子

- (1) 加 1.0 mL 100 mM NiSO₄, 漩涡振荡混合 20 min 以上; 磁分离, 去上清液。
- (2) 加 1.0 mL 去离子水, 漩涡振荡器 5.0 min; 磁分离, 去上清液; 重复洗涤步骤三次。

4. 目标蛋白结合

将样品液加到螯合 Ni 离子磁珠 EP 管中, 用移液器轻轻吹打磁珠数次, 再手动旋摇 EP 管充分混匀, 反应 10~30 min 且每隔数分钟混匀一次(旋转混合仪上持续混合更好); 磁分离结合蛋白, 取出上清液到新的 EP 管中为未结合蛋白; 结合蛋白的磁珠尽快用于后续步骤。

5. 非特异吸附成分的洗涤

- (1) 加 10 mL 洗涤缓冲液与结合蛋白磁珠混匀, 用移液器轻轻吹打磁珠悬液数次使磁珠重新悬浮, 转移至另外一个新的 EP 管(避免原磁珠管壁上非特异性吸附蛋白干扰后续操作), 磁分离回收磁珠, 取出上清液(非特异吸附成分)到新的 EP 管中, 备后续监测;
- (2) 重复上述步骤 2 次; 上清液合并后为非特异吸附成分; 结合蛋白磁珠尽快用于后续步骤。

6. 目标蛋白的洗脱

- (1) 据对实验的需要, 可直接加入显色底物或发光底物的缓冲液, 测定结合酶蛋白活性;
- (2) 据对目标蛋白浓度的需要, 加 1~10mL 洗脱缓冲液; 用移液器轻轻吹打磁珠数次使磁珠悬浮并与洗脱缓冲液中成分充分竞争结合反应 5~30 min; 磁分离回收磁珠到新的试管中并尽快用洗脱缓冲液悬浮, 收集洗脱液到新的 EP 管中, 即为纯化的目标蛋白样品。

7. 磁珠使用后处理与再使用

- (1) 将悬浮磁珠置于漩涡振荡器上剧烈震荡充分混匀，磁分离，去除上清液。
- (2) 加 5 mL 结合缓冲液，漩涡振荡充分混匀，磁分离，去除上清液；重复两次。
- (3) 用结合缓冲液洗涤后磁珠可直接用于下一次蛋白纯化（只用于同一种蛋白的纯化）。
- (4) 用去离子水洗涤，磁分离去水，加 20% (v/v) 乙醇水，2°C~8°C 短期保存，备用。

8. 磁珠再生

磁珠连续使用三次后，结合带 6His 标签蛋白的能力会明显降低，对于目标蛋白丰度很低的样品则磁珠再用效力更低，通常需再生后才适宜再用。建议再生缓冲液及过程如下：

再生缓冲液：20 mM Tris-HCl, 300mM NaCl, 100mM EDTA, pH7.4

补给缓冲液：100 mM NiSO₄ / CuSO₄ / CoSO₄ (补 Ni 缓冲液有毒，使用时务必小心！)

磁珠再生过程

- (1) 将 60 mg 磁珠悬浮液磁分离，去除上清液，保留磁珠。
- (2) 加 2.0 mL 再生缓冲液，漩涡振荡 5.0 min 以上；磁分离，去上清液；重复此步骤一次。
- (3) 加 2.0 mL 去离子水，漩涡振荡 5.0 min 以上；磁分离，去上清液；重复该步骤两次。
- (4) 加 1.0 mL 补给缓冲液，漩涡振荡混合 20 min 以上；磁分离，去上清液。
- (5) 加 1.0 mL 去离子水，漩涡振荡器 5.0 min；磁分离，去上清液；重复洗涤步骤三次。
- (6) 再生磁珠直接用于下一次蛋白纯化，或加 20% (v/v) 乙醇水，2~8°C 短期保存备用。

应用过程示例 2：带 6His 标签融合蛋白的固定化及应用

如用 MSP-NTA 固定化带 6His 融合蛋白，则整合 Ni²⁺ 洗涤后磁珠直接与带 6His 标签蛋白结合，用量比例约 16 mg 蛋白/g MSP-NTA；结合缓冲液推荐用 pH 8.0，如 Tris-HCl。

固定化带 6His 蛋白适合用于 pull-down 分析相互作用蛋白、磁分离测定结合配体亲和力、选择性富集混合物中的高亲和力配体或蛋白突变体。

应用提示：

1. 提高目标蛋白回收率的推荐策略：

- (1) 延长蛋白样品与磁珠混合反应的时间；
- (2) 降低样品和结合缓冲溶液中的咪唑浓度；
- (3) 样品和缓冲液中添加表面活性剂等物质；
- (4) 添加合适的蛋白酶抑制剂，防止目标蛋白降解；
- (5) 如需要，增加磁珠的用量以提高目标蛋白回收量；

2. 提高目标蛋白纯度的推荐策略:

- (1) 提高样品和结合缓冲溶液中咪唑、NaCl 的浓度;
- (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) 延长洗涤的时间, 增加洗涤次数;
- (5) 采用梯度咪唑浓度洗脱目标蛋白;
- (6) 提高样品中目标蛋白的丰度, 最好大于 7%。

相关提示

1. MSP-NTA 耐受的处理条件:

常用有机溶剂(如发生团聚, 需剧烈震荡分散均匀后才有结合能力); 沸水处理 10 min; pH 6.0~12.0 常见缓冲液长时间浸泡; 不超过 0.5% 的中性表面活性剂(处理后再使用前需仔细洗涤去除残留表面活性剂); 中性及碱性的蛋白变性剂(控制 pH 在 4.0 以上以免磁芯溶解)。

2. MSP-NTA 不耐受的处理条件

DTT 等还原剂; 与 His-tag 中组氨酸残基竞争结合金属离子的物质, 如 Glu、His 等; EDTA、EGTA 等螯合剂; 与上述物质接触后, 补充所需金属离子可再生后使用。

警示

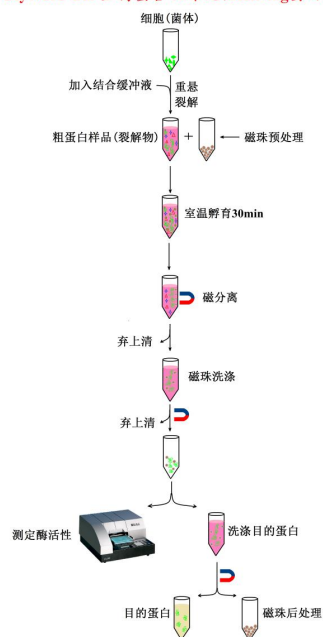
1. 冷冻、干燥和离心都会引起磁珠团聚无法再分散, 失去效用;
2. 在使用本产品前, 请务必充分振荡混合, 使磁珠悬浮均匀;
3. 移液器吸头和反应管, 需避免因粘附磁珠而造成磁珠损失;
4. 产品保存液中含剧毒成分, 切记避免吞咽, 必须远离儿童;
5. 本产品严禁用于人体, 可用于研究及体外诊断。

附录 1 NTA 磁珠的产品规格和货号

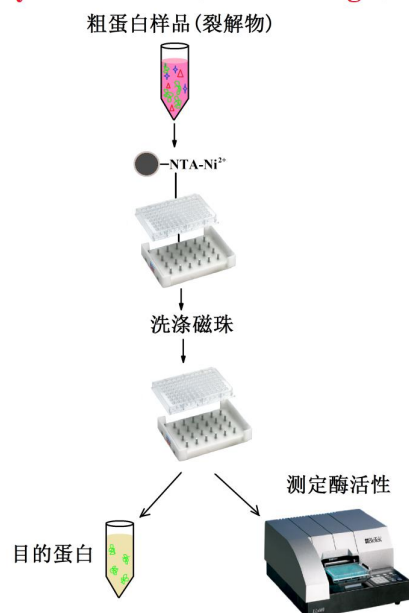
6His标签 蛋白吸附 磁珠	MSP-NTA-Z1	18050206-10	10 mg	悬液, 塑料瓶	定制; 订单确认 后, 五个 工作日内 发货	用MSP-COOH-Z1羧基活化后偶联 NTA氨基制备, 官能团的连接臂 合计长达12原子; 用100 mM NiSO4镍离子与NTA饱和螯合, 再吸附带6His标签的蛋白及其 复合物; 磁珠表面NTA-Ni以外 位点对蛋白的吸附很弱
		18050206-20	20 mg	悬液, 塑料瓶		
		18050206-100	100 mg	悬液, 塑料瓶		
		18050206-500	500 mg	悬液, 塑料瓶		
		28050206-X	待定	悬液, 塑料瓶		

附录 2 NTA 磁珠的操作示意图

FlyW&Y Bio 金属螯合磁珠纯化His-tag蛋白操作流程



FlyW&Y Bio 磁珠纯化His-tag蛋白



参考文献:

- [1] Yuanli Li, Gaobo Long, Xiaolan Yang, Xiaolei Hu, Yiran Feng, Deng Tan, Yanling Xie, Jun Pu, Fei Liao*. Approximated maximum adsorption of His-tagged enzyme/mutants on Ni²⁺-NTA for comparison of specific activities. *Int J Biol Macromol* 2015; 74: 211-217.
- [2] Xiaolan Yang, Xiaolei Hu, Chunyan Chen, Gaobo Long, Jing Wu, Deng Tan, Yuanli Li, Yiran Feng, Jun Pu, Fei Liao*. Comparison of the immobilization of 6His-tagged proteins on magnetic-submicron-particle functionalized with Ni²⁺-NTA and bis-sulfone. *Nanosci Nanotechn Lett* 2015, 7(6):486-494.