

NHS-Activated Magnetic Beads

NHS 活化磁珠



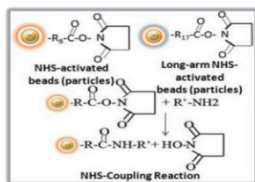
产品信息:

货号	规格
BI-105	1ml (30mg/ml)

产品介绍:

NHS-Activated Magnetic Beads 是均匀的,表面覆盖有高密度NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)官能团的磁珠。磁珠通过形成稳定的酰胺键方式,快速、高效的共价结合任何含有伯胺的配体(图 1)。本款磁珠可以在偶联条件下快速完成反应(室温 pH 6.5-9 下 15-30 分钟,4°C 下 4 小时),且不需要危险化学品。NHS-activated Magnetic Beads 最适于结合大分子蛋白。Long-arm NHS-activated Magnetic Beads 被推荐用于结合小肽分子,因为其长臂(21-原子)的亲水连接基团可以减少位阻现象。

NHS-activated Magnetic Beads 可以完美地作为亲和树脂进行亲和纯化,将分子、细胞和部分细胞提取物进行提炼纯化。在与配体结合后,将磁珠添加到含有目标分子的样品中,然后混合、孵育、洗涤和洗脱目标分子(图2)。



产品特点及优势:

- 预活化即用型磁珠
- 便于使用
- 在pH7.4, 4°C-25°C条件下可以快速偶联
- 稳定的共价键, 低水平的配体泄漏
- 可重复使用的免疫亲和基质
- 极低非特异性结合率
- 用途: 用于纯化抗体, 蛋白质/肽, DNA / RNA;细胞筛选、免疫沉淀

产品属性:

组成	二氧化硅包裹的氧化铁磁珠，表面有高密度的NHS (N-羟 基琥珀酰亚胺) 基基团	
	温度: 4°C -140°C; 可溶于大多数有机溶剂	
磁化	~40-45 EMU/g	
磁化的类型	超顺磁性	
保存状态	冻干粉	
功能组密度	1µm Magnetic Beads	~250 µmole / g of Beads
	2.5µm Magnetic Beads	~235 µmole / g of Beads
	5µm Magnetic Beads	~200 µmole / g of Beads
	1µm Long-Arm -Magnetic	~210 µmole / g of Beads
	2.5µm Long-Arm	~200 µmole / g of Beads
	5µm Long-Arm Magnetic	~170 µmole / g of Beads
储存	储存在 -20°C, 收货时不含水分	

操作步骤

提示:

强烈建议在实验过程中进行滴定优化，以确定每个实验中应用的磁珠数量。该协议可以相应地放大和缩小。

避免使用含有 tris 或其他含有伯胺类试剂的缓冲液，因为它们与预期的偶联反应竞争。

A.所需耗材

1.磁力分离器（适用于手动操作）：根据实验时生物样品的体积，使用者可以选择以下不同型号的磁力分离器：8孔磁力架可以容纳8个单独的1.5-2.0 ml离心管；24孔磁力架可以容纳24个单独的1.5-2.0 ml离心管；4孔磁力-15可以容纳4个单独的15ml离心管；4孔磁力架-50可以容纳四个单独的50 ml离心管。

2.Coupling Buffer: 0.1M 磷酸钾, 0.15 M NaCl, pH 7.4

3.Wash Buffer: 0.05 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 8.0

4. Blocking Buffer: 1 M 乙醇胺, pH 9.0

B.磁珠的准备

- 1.用丙酮（30 mg/ml）制备 3%的磁珠，并充分混合。提示：将未使用的磁珠可以在丙酮溶液中，储存在 4°C。可保存一年时间。
- 2.将 100 μ l（3mg）的磁珠转移到离心管中。
- 3.将试管放在磁力分离器上 1-3 分钟。当磁珠完全沉淀时，去除上清液。从磁力分离器上取下试管，加入 1ml 的 coupling buffer 用通过涡旋 30 秒重新悬浮磁珠。
- 4.重复步骤 3 两次。
- 5.去除上清液，将清洗的磁珠准备进行耦合反应。

注：使用 coupling buffer 重新水化后，由于官能团的稳定性，应尽快使用磁珠。

C.蛋白质的偶联

- 提示：NHS 活化磁珠的偶合效率因配体而异。用户可根据经验优化配体的浓度。蛋白质的建议结合浓度为 0.5-10 mg/ml。对于小分子多肽，配体浓度应至少为 200 μ mol/ml。用 coupling buffer 制备 100 μ l 蛋白质溶液（0.5-1mg/ml）或多肽溶液（200 μ mol/ml）并与 1.述清洗过的磁珠混合。如果样品已经悬浮在另一个缓冲液中，用等量的 coupling buffer 稀释样品。
- 2.在室温条件下，连续旋转孵育 4-6 小时或者过夜。提示：使用者应该对反应时间进行优化。
 - 3.将试管放在磁力分离器上 1-3 分钟。当磁珠完全沉淀时，去除上清液。从磁力分离器上取下试管，加入 1ml 的 coupling buffer 用通过涡旋 30 秒重新悬浮磁珠；再将试管放在磁力分离器上 1-3 分钟。当磁珠完全沉淀时，去除上清液。
 - 4.用 1ml 的 Washing buffer(或者 1 M NaCl)清洗磁珠，重复 3-4 次。
 - 5.向磁珠中添加 0.5-1ml 的 blocking buffer(BSA 也可以封闭磁珠，PBS, pH7.4, 0.1%BSA)，并在室温下培养 1 小时或在 4°C 下过夜。
 - 6.用 1ml 预冷的 Washing buffer 将磁珠洗涤 3 次。
 - 7.用 pH 7.4 含有 0.1% BSA, 0.01%叠氮化物 (w/v) 的 PBS 缓冲液重新悬浮磁珠至所需浓度，并在 4°C下储存，直至使用。不要冷冻保存。

D. 常见亲和纯化过程

提示：

该方案是一个通用的亲和纯化发法。因为没有两种蛋白质是完全相同的，所以不可能为所有的蛋白质纯化设计一个通用的协议。为了获得最佳结果，每个用户必须确定纯化单个目标蛋白的最佳工作条件。

强烈建议根据粗样品中目标蛋白质的含量，进行滴定，以优化每个单独实验中使用的磁珠数量。使用过多的磁珠将导致较高的背景，而使用过少的磁珠将导致 较低的产量。每

毫克磁珠通常可与 1-20 μ g 靶蛋白结合。

- 1.将适量的珠子转移到离心管中。将管放在磁力分离器上 1-3 分钟。当磁珠完全沉淀时，去除上清液。
- 2.取下试管，加入 5 倍磁珠溶液体积的 PBS 缓冲液，通过震荡重新悬浮磁珠，涡旋 30 秒。将试管至于室温环境 1-3 分钟，再将管放在磁力分离器上 1-3 分钟。当磁珠完全沉淀时，去除上清液。
- 3.重复步骤 2 两次。
- 4.向含有目标蛋白质的粗样品中添加洗涤过的磁珠，并在室温或所需温度下温浴 1-2 小时（温度越低，培养时间越长）。提示：强烈建议进行滴定实验以优化培养时间。因为孵化的时间太长可能会导致很高的背景。
- 5.用 5 倍磁珠体积的 PBS 缓冲液或 1M NaCl 彻底清洗磁珠，直到 280nm 处洗脱液的吸光度接近背景水平（OD 280<0.05）。提示：添加更高浓度的盐、非离子洗涤剂 and 还原剂也可能降低非特异性背景。例如，向洗涤缓冲液中添加 NaCl（浓度为 1-1.5 M）、0.1-0.5% 的非离子洗涤剂，如 TritonX-100 或 Tween-20，以及还原剂，如 DTT 或 TCEP（我们通常使用 3mM）。
- 6.通过适当的方法，如低 pH（2-4）、高 pH（10-12）、高盐、高温、亲和洗脱或 SDS-PAGE 上样缓冲液中煮沸，洗脱目标蛋白。

BM20220526