

**公司产品仅供科学研究使用、不得用于临床诊断！****商品属性：**

产品名称	规格	货号
Carboxyl-Terminated Magnetic Beads 羧基磁珠	20mg	A-Hc2062

**产品介绍：** Carboxyl-Terminated Magnetic Beads 是均匀的，表面覆盖有高密度羧基官能团的 二氧化硅基质的磁珠。它的亲水性表面基团保证了磁珠在实验过程中，具有极低的非 特异性吸附率、且有良好的分散性，并易于在各种缓冲液中处理。磁珠表面上高密度 的具有悬垂功能性的羧基基团，可以通过形成稳定的酰胺键共价结合含伯胺的配体。 Carboxyl-Terminated Magnetic Beads 适合结合大的蛋白质。 Long-arm Carboxylterminated Magnetic Beads 建议结合小分子肽回收， 因为长臂的亲水连接基团可以减少位阻现象。 Carboxyl-Terminated Magnetic Beads 可以完美地作为各种生物分离实验的亲材 质，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。

**产品特点：**

- 便于使用
- 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
- 极低的非特异性结合率
- 可固定 1-10mg 蛋白或 0.1-1mg 多肽/ml 的磁珠

**用途：** 用于纯化抗体，蛋白质/肽，DNA / RNA；细胞筛选、免疫沉淀

**操作步骤：**

提示：

1. 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。
2. Coupling buffers 应具有最小的离子强度，且不应含有任何具有氨基（如 Tris）或羧基（如 醋酸盐、柠檬酸盐）的成分。但 Wash buffers 或者 Storage buffers 可含有氨基或羧基。

所需耗材和试剂：

磁力分离器（适用于手动操作）：根据实验时生物样品的体积，使用者可以选择一下不同型号的磁力分离器。

Coupling Buffer: 10 mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0.15 M NaCl, pH 5.5 或者 0.1 M MES 缓冲液, 0.15 M

NaCl, pH 4.5-5.5. EDC [1-ethyl-3 (3-dimethylaminopropyl) carbodiimide], Sigma, Cat# E7750

NHS (N-hydroxysuccinimide), Sigma, Cat#56480

Wash/Storage Buffer: 10 mM Tris, 0.15 M NaCl, 0.1% (w/v) BSA, 1mM EDTA, 0.01%叠

氮化钠, pH 7.5

Blocking buffer: 1 M Glycine, pH 8.0

**I. 一步法偶联实验过程：**

提示：一步偶联方式适用于不含羧基基团的配体，因为羧基基团可能与缓冲液中 EDC反应并导致配体聚合。但是，由于该方法简单且通常具有较高的产率，因此它仍然是首选的耦合方法。为了补偿因为聚合造成的配体损失，可以在偶联反应中加入较多的配体。

**A. 磁珠准备**

1. 将 30mg 磁珠与 1ml 的 Coupling buffer 在离心管中混合，并通过涡旋或移液器吹吸方式充分混合。
2. 将试管插入磁力分离器中 1-3 分钟，直到上清液变的澄清。将试管留在磁力分离器中的同时，用移液器吸出并丢弃上清液。
3. 磁珠准备用来偶联。

**B. 蛋白的偶联**

1. 用 Coupling buffer 制备 1ml 蛋白质溶液（0.5-1mg/ml），并与上述所得磁珠混合，并充分混匀。
2. 制备新鲜的含有 2%的 EDC 溶液的 Coupling buffer。注意：准备后 15 分钟内使用。
3. 向蛋白质溶液中加入 100μl 上述 2% EDC 溶液并充分混合。
4. 室温条件下，在保持良好混匀情况下过夜孵育。

**C. 清除未结合蛋白**

1. 反应完成后，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. 清洗磁珠使用 5 ml 的 Wash/storage buffer, 重复三次。
3. 在室温下用 1ml 的 Blocking buffer, 在保持良好混匀情况下将磁珠孵育 1-2 小时。
4. 使用 5ml 的 Wash/storage buffer 清洗磁珠三次
5. 用所需体积的 Wash/storage buffer 悬浮磁珠, 并在 4°C 下储存。

#### II. 两步偶联法实验过程:

提示: 两步方案: 该方案适用于含有羧基的配体, 或者只有有限数量的配体可用

##### A. 磁珠准备

1. 将 30mg 磁珠与 1ml 的 Coupling buffer 在离心管中混合, 并通过涡旋或移液器吹吸方式充分混合。
2. 将试管插入磁力分离器中 1-3 分钟, 直到上清液变的澄清。将试管留在磁力分离器中的同时, 用移液器吸出并丢弃上清液。
3. 制备新鲜的含有 5% EDC 和 5% NHS 的 Coupling buffer。注意: 准备后 15 分钟内使用。
4. 向含有磁珠的试管中加入 500 $\mu$ l 上述含有 5%EDC 和 5% NHS 的 Coupling buffer 并充分混合。
5. 在室温下, 保持磁珠良好混匀情况下, 将磁珠孵育 30 分钟。
6. 孵育完成后, 将试管插入磁力分离器中 1-3 分钟, 直到上清液变的澄清。将试管留在磁力分离器中的同时, 用移液器吸出并丢弃上清液。
7. 清洗磁珠使用 5 ml 冰浴过的 Coupling buffer, 重复三次。
8. 磁珠准备用来偶联。

##### B. 结合蛋白

1. 用 Coupling buffer 制备 1 ml 蛋白质溶液 (0.5-1mg/ml), 并与上述所得已清洗的磁珠混合。
2. 在室温下孵育过夜, 过程中确保充分混合。

##### C. 清除未结合蛋白

1. 反应完成后, 将试管放在磁力分离器上 1-3 分钟。当磁珠完全吸附到磁力分离器上时, 去除上清液。
2. 使用 5 ml 的 Wash/storage buffer 清洗磁珠, 重复三次。
3. 在室温下用 1ml 的 Blocking buffer, 在保持良好混匀情况下将磁珠孵育 1-2 小时。
4. 使用 5ml 的 Wash/storage buffer 清洗磁珠三次
5. 用所需体积的 Wash/storage buffer 悬浮磁珠, 并在 4°C 下储存。

#### III. 通用亲和层析方法

提示:

该方案是一个通用的亲和纯化方法。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。

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生。每毫克磁珠通常可与 1-20  $\mu$ g 靶蛋白结合。

1. 将适量的磁珠转移到试管中。将试管放在磁力分离器上 1-3 分钟。当磁珠完全吸附时, 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孵育 1-3 分钟, 再将管放在磁力分离器上 1-3 分钟。当磁珠完全吸附时, 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孵育 1-2 小时 (温度越低, 孵育时间越长)。
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 处洗涤液的吸光度接近背景水平 ( $OD_{280} < 0.05$ )。
6. 通过适当的方法洗脱目标蛋白, 如低 pH (2-4)、高 pH (10-12)、高盐、高温、亲和洗脱或加入 SDS-PAGE 上样缓冲液煮沸。