

Beads GSH

货号: AC12990

规格: 5mL,10%(V/V)

保存: 2-8°C, 保质期2年。

产品内容:

GST 融合蛋白纯化磁珠是专为高效、快速纯化谷胱甘肽巯基转移酶 (GST) 融合蛋白而设计的一种新型功能化材料, 可通过磁性分离方式直接从生物样品中一步纯化出高纯度的目标蛋白, 极大地简化纯化工艺和提高纯化效率, 适合科研和工业领域便捷地进行 GST 融合蛋白的纯化。与传统的柱层析纯化方式相比, 采用纯化 GST 融合蛋白, 无需对粗蛋白样品进行多次长时间的高速离心及滤膜过滤、无需控制流速、更不需要昂贵的层析设备。样品与磁珠的特异性结合、洗涤及目标蛋白洗脱变得非常简单、快速、易操作。对于熟练的操作者而言, 在 1 h 内就能获得高纯度的目的蛋白, 且能轻松实现高通量和大规模样品的平行处理, 为研究者节省了时间和成本。

产品特性:

产品名称	Beads GSH
磁珠粒径	30 μm -150 μm
GSH 配基含量	20-30 $\mu\text{mol/mL}$ (100%磁珠)
GST 融合蛋白结合量 ¹	可达 10 mg/mL (100%磁珠)
悬液浓度 ²	10% (v/v) 磁珠悬液
保存液	20% (v/v) 乙醇
化学稳定性	常温可耐受 70%乙醇、6 M 盐酸胍、0.1 M 氢氧化钠、0.1 M 醋酸 1 h

注意事项:

- 1、磁珠蛋白结合量与目标蛋白特性相关, 此处仅做参考值。
- 2、1 mL 磁珠悬液中含有 100 μL 磁珠。

适用范围

适用于谷胱甘肽巯基转移酶 (GST) 融合蛋白、谷胱甘肽转移酶以及与谷胱甘肽有亲和作用的其它蛋白的分离纯化。

手动操作步骤:

目标蛋白与磁珠的结合性能将直接影响目标蛋白的纯化效率, 各种缓冲液配制也将在一定程度上影响目标蛋白的回收率和纯度。因此, 在较大规模蛋白纯化之前, 用户应该自行设计实验, 筛选出适合目标蛋白的缓冲液, 包括 Binding /Washing Buffer (Buffer A) 及 Elution Buffer (Buffer B)。以下提供一个较强结合力的 GST 标签蛋白的纯化流程, 供用户参考。

以下操作过程需要准备的试剂:

缓冲液名称	成分
Buffer A	pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.8 mM KH ₂ PO ₄ ,
Buffer B	pH 8.0, 50 mM Tris-HCl, 10 mM 还原型谷胱甘肽, 配制方法: 0.1 M Tris 溶液 50 mL, 0.307 g 还原型谷胱甘肽, 然后用 0.1 M 盐酸调 pH 到 8.0, 加去离子水至 100 mL。

注意事项:

- 1、还原型谷胱甘肽容易被氧化, Buffer B 要求现配现用;
- 2、不同的 GST 融合蛋白与磁珠结合的强弱程度不同,对大部分的 GST 融合蛋白,使用含有 10 mM 还原性谷胱甘肽的 BufferB 即可洗脱目标蛋白;对少数结合能力较强的 GST 融合蛋白,可以适当延长洗脱时间,增加洗脱次数,或提高 Buffer B 中还原型谷胱甘肽的浓度;
- 3、Buffer A 和 Buffer B 中可以添加 1~5 mM EDTA、1~10 mM DTT、0.1~1.0% Triton X-100、0.1~1.0% Tween 20 等,以提高目标蛋白的稳定性。

样品处理

- 1、大肠杆菌、酵母等细胞内表达蛋白:表达细胞用适量 Buffer A 稀释,加入蛋白酶抑制剂(如终浓度为 1 mM 的 PMSF);冰浴超声裂解细胞,即为粗蛋白样品。如果样品过于粘稠,可根据需要在粗样品中加入适量核酸酶,在冰上放置 30 min,以降解核酸。另外,如果目标蛋白含量较低,建议将粗蛋白样品进行离心操作。
- 2、胞外表达蛋白:取胞外表达上清,用等量 Buffer A 稀释平衡,即为粗蛋白样品。
- 3、动物细胞胞内表达蛋白:取适量动物细胞,用适量 PBS 洗涤 1 次,弃上清;用适量含 1% (v/v) Triton X-100 或 1% (v/v) NP-40 的 Buffer A 重悬;加入蛋白酶抑制剂(如终浓度为 1 mM 的 PMSF);置于冰上 10 min,即为粗蛋白样品。

磁珠预处理

一般情况下,磁珠的使用量是由用户根据目标蛋白产量和磁珠载量信息计算获得。例如:采用大肠杆菌表达某目标蛋白,250 mL 发酵液收获 1 g 湿重的菌体,通过预实验估算其目标蛋白产量为 5~10 mg,用户需要取 10 mL 10%的磁珠悬液用于目标蛋白的纯化。以下即以此为例进行详细说明:

- 1、将磁珠产品置于漩涡混匀器上充分混匀,用移液器取 10 mL 磁珠悬液于离心管中;
- 2、将离心管置于磁性分离器上,待溶液变澄清后,移去上清液;
- 3、加入 5~10 mL Buffer A 到上述装有磁珠的离心管中,盖紧盖子,漩涡振荡 15 s,使磁珠重新悬浮。将离心管置于磁性分离器上,磁性分离*,移去上清液,重复洗涤 2 次。

(注意事项:在磁性分离过程中,为了减少磁珠在使用过程中的损耗,待溶液变澄清后,盖紧离心管盖子,保持离心管仍在磁性分离器上,手持磁性分离器与离心管上下翻转数次,使澄清的溶液涮洗离心管盖上残留的磁珠,静置片刻,使溶液重新变澄清;以下同。)

目标蛋白与磁珠结合

- 1、用 10 mL Buffer A 悬浮 1 g 湿重的菌体,进行破碎和裂解后,即为粗蛋白样品;
- 2、将粗蛋白样品加入到装有预处理磁珠的离心管中,盖紧离心管盖;

3、将离心管置于漩涡混匀器振荡 15 s，然后置于旋转混合仪上，室温旋转混合 20~30 min（如果需要，可在 2~8℃的低温环境下旋转混合约 1 h，防止目标蛋白降解）；将离心管置于磁性分离器上进行磁性分离，移出上清液到新的离心管中以备后续检测。从磁性分离器上取下离心管进行后续洗涤步骤。

磁珠洗涤

1、加入 5~10 mL Buffer A 到装有磁珠的离心管中，旋转混合 2 min，磁性分离，移出清洗液到新的离心管中，以备取样检测；

2、加入 5~10 mL Buffer A 到装有磁珠的离心管，使磁珠重新悬浮，将磁珠悬液转移至新的离心管，避免原离心管壁上非特异性吸附蛋白污染目标蛋白；磁性分离，移出上清液到清洗液收集管。

标蛋白洗脱

1、加入 2~5 mL Buffer B（用户可根据需要改变洗脱体积调整目标蛋白浓度）于离心管中，盖紧离心管盖，然后将离心管置于旋转混合仪上，室温旋转混合 2 min；磁性分离，收集洗脱液到新的离心管中，即为纯化的目标蛋白样品；

2、如果需要，可以重复上述步骤 1 次，收集样品到新的离心管中，以检测目标蛋白是否洗脱完全。

磁珠清洗和保存

磁珠使用后经过简单清洗处理后，可以继续用于后续的纯化操作，也可以长时间保存。用户可根据磁珠使用的情况选择不同的清洗方法，主要有以下几种情况：

情况 1：重复使用次数较少，结合能力下降不明显时，可以采用高 pH 和低 pH buffer 交替洗涤的方式进行清洗

1、高 pH 洗（碱洗）：使用后的磁珠加入 10 mL Buffer C（即 0.1 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 8.5），漩涡振荡 60 s，磁性分离，去除上清液—；

2、低 pH 洗（酸洗）加入 10 mL Buffer D（即 0.1 M 醋酸钠, 0.5 M NaCl, pH 4.5），漩涡振荡 60 s，磁性分离，去除上清液；

3、重复碱洗、酸洗交替清洗 2 次，共 3 次。

情况 2：重复使用次数较多时，由于沉淀、变性或非特异性吸附蛋白积累，导致磁珠结合目标蛋白的能力明显下降。去除沉淀或变性蛋白，可按下面的方法进行洗涤：

1、先用 5 mL 6 M 盐酸胍洗涤 2 次，每次漩涡振荡 60 s，磁性分离，去除上清液；

2、再用 10 mL 1×PBS 洗涤 3 次，每次漩涡振荡 60 s，磁性分离，去除上清液。

情况 3：去除疏水性结合物质，可按下面的方法进行洗涤：

1、先用 5 mL 70%乙醇或浓度为 0.1%的非离子型表面活性剂洗涤 3 次，每次漩涡振荡 60 s，磁性分离，去除上清液；

2、再用 10 mL 1×PBS 洗涤 3 次，每次漩涡振荡 60 s，磁性分离，去除上清液。

注：完成情况 1 或情况 2 的清洗操作后，如果用户需要继续使用磁珠用于蛋白纯化，需先用 Buffer A 洗涤 2~3 次。 如果不需要继续使用，则用 20%乙醇洗涤磁珠 2~3 次后，再加入 20%（v/v）乙醇到磁珠中使总体积为 10 mL，保存于 2~8℃。

蛋白纯化流程的优化

以上操作流程适用于大部分 GST 融合蛋白的纯化，根据目标蛋白与 GST 融合蛋白纯化磁珠的结合性能不同，用户可以从以下几个方面对纯化流程进行优化，以提高目标蛋白的回收率和纯度。

1、提高目标蛋白回收率的参考方法：

- (1) 延长蛋白溶液与磁珠孵育的时间；
- (2) 样品及缓冲液中加入 1~10 mM 的 DTT，有助于提高部分 GST 融合蛋白与磁珠的结合；
- (3) 添加合适的蛋白酶抑制剂，防止目标蛋白降解；
- (4) 增加磁珠用量；
- (5) 延长洗脱目标蛋白的时间或增加洗脱次数；
- (6) 使用新鲜配制的 Buffer B 保证目标蛋白洗脱效率。

2、提高目标蛋白纯度的参考方法：

- (1) 避免剧烈的超声破碎造成 GST 标签与目标蛋白发生断裂；
- (2) 在纯化过程中添加合适的蛋白酶抑制剂，防止目标蛋白降解；
- (3) 在样品溶液和缓冲液中加入 0.1%的 Tween20 或 2% 的 NP-40 可降低非特异蛋白的吸附；
- (4) 延长洗涤时间，增加洗涤次数；
- (5) 采用梯度浓度还原型谷胱甘肽洗脱目标蛋白。

注意事项

- (1) 首次使用本产品前，请务必仔细阅读本用户手册；
- (2) 磁珠使用和保存过程中应避免冷冻、干燥和高速离心等操作；
- (3) 在使用本产品前，请务必充分振荡使磁珠保持均匀的悬浮状态；
- (4) 请选用质量好的移液器吸头和离心管，以免磁珠贴壁或混合过程发生渗漏引起磁珠的损耗；
- (5) 磁珠与溶液混合过程中，如果溶液粘稠无法通过翻转离心管重悬磁珠，可采用移液器反复吹吸或短时漩涡混合使磁珠充分重悬；
- (6) 用户可根据实际需要保留经磁性分离移去的上清液，进行取样检测，以便分析纯化过程和优化蛋白纯化流程；
- (7) 本产品可以重复使用，重复使用时，建议纯化同种蛋白，纯化不同种类的蛋白时，建议使用新的磁珠，以防交叉污染；
- (8) 本产品需与磁性分离器配套使用；
- (9) 本产品仅供研究使用。