

使用说明书

Instruction Manual

TargetMol
YOUR TARGET MOLECULES

Strep-tag II 蛋白纯化磁珠

Magrose Beads Strep-Tactin

产品描述

TargetMol Strep-tag II 蛋白纯化磁珠采用特殊的蛋白偶联工艺，将 Strep-Tactin 蛋白共价偶联到超顺磁性磁珠表面，是专为分离纯化 Strep-tag II 蛋白设计的一种新型功能化材料，可以高效快速地获得高纯度纯化蛋白。

Strep-tag II 蛋白纯化磁珠采用 Strep-Tactin/Strep-Tag 新型蛋白纯化系统，模拟链霉亲和素-生物素系统，将高特异性与温和的洗脱条件相结合。与其他 tag 相比，Strep-tag II 由 8 个氨基酸的小标签 (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) 组成，标签的小尺寸减少了对靶蛋白结构或功能的潜在干扰，无需切除，不影响融合后蛋白质的结构和功能。Strep-Tactin 对 Strep-tag II 的亲和能力较链霉亲和素提高了近 100 倍，且分离纯化条件温和，在生理条件下即可实现蛋白的分离纯化，可以保存蛋白质的生物活性，获得纯度超 99% 的目标蛋白。

产品特点

- 纯化条件温和，单步纯化纯度优于 His 标签，不影响融合后蛋白质的结构和功能。
- 高亲和力，对 Strep-Tag II 标签的结合能力远高于链霉亲和素，填料更高效，能更快速的分离纯化标签蛋白。
- 磁珠可再生，多次使用后仍能保持良好的性能和高效的结合能力。通过适当的再生处理，磁珠表面的活性基团可以大部分恢复，确保其在重复使用过程中依然能够有效地与目标分子结合。

产品信息

Strep-tag II 蛋白纯化磁珠	特性
磁珠粒径	30-150 μm
配基含量	~6 mg Strep-Tactin/mL Gel
蛋白结合量 ^a	~7 mg Strep-tag II 蛋白/mL Gel
悬液浓度 ^b	10% (V/V) 磁珠悬液
保存溶液	1×PBS, 含 0.1% Tween-20 和 0.1% Proclin 300

注: a) 磁珠蛋白结合量与目标蛋白特性相关，此处仅做参考值。b) 1 mL 磁珠悬液中含有 100 μL 磁珠。

产品应用

- 适用于任何表达系统中含有 Strep-Tag II 标签蛋白的分离纯化，包括杆状病毒、哺乳动物细胞、酵母和细菌等。

操作说明

1. 缓冲液准备

以下为常用的缓冲液成分，适用于多数 Strep-Tag II 蛋白的纯化，使用时可根据需要进行调整。缓冲液在使用前最好使用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤除菌。

- 1) Binding/Washing Buffer: 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 含 0.03% Proclin 300, pH 8.0。
- 2) Elution Buffer: 2.5 mM desthiobiotin in Binding Buffer。
- 3) Regeneration Buffer: 0.5 M NaOH or 1 mM HABA in Binding Buffer。

2. 蛋白样品处理

- 1) 大肠杆菌、酵母等细胞内表达蛋白: 用适量 Binding/Washing Buffer 稀释表达细胞，加入蛋白酶抑制剂 (如 1 mM PMSF 或蛋白酶抑制剂 Cocktail C0001)，重悬细胞后冰浴超声裂解细胞，即得到粗蛋白样品。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，冰浴 30 min，以降解核酸。也可以根据实际需要可对蛋白样品进行离心操作。
- 2) 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，吸去上清液，再用适量含 1% (v/v) Triton X-100 或 1% (v/v) NP-40 的 Binding/Washing Buffer 重悬，加入蛋白酶抑制剂，冰浴 10 min，即得到粗蛋白样品。
- 3) 胞外表达蛋白: 取胞外表达的上清液，用等量的 Binding/Washing Buffer 稀释，即得到粗蛋白样品。

3. 磁珠预处理

磁珠用量需要根据目标蛋白产量和磁珠载量信息计算。例如，使用大肠杆菌表达某目标蛋白，250 mL 的发酵液可收获 1 g 湿重的菌体，通过预实验估算其目标蛋白产量为 ~7 mg，则需要取 10 mL 10% 的磁珠悬液用于目标蛋白的纯化。以此为例介绍操作步骤：

- 1) 将 Strep-tag II 蛋白纯化磁珠用漩涡振荡器振荡充分混匀，然后使用移液器吸取 10 mL 磁珠悬液置于 15 mL 离心管中。将离心管放入磁性分离器，静置 1 min，进行磁性分离，吸去上清液，取下离心管。
- 2) 向离心管中加入 5-10 mL Binding/Washing Buffer，振荡混匀，使磁珠重新悬浮。接着进行磁性分离，吸去上清液。重复洗涤步骤 2 次。
注：在进行磁性分离时，为了减少磁珠的损耗，当溶液变澄清后，应先盖紧离心管盖子，保持离心管放置在磁性分离器上。随后，手持磁性分离器与离心管一起上下翻转数次，使澄清的溶液冲刷掉离心管盖上残留的磁珠。静置片刻，待溶液再次变澄清后再进行后续操作。此步骤适用于后续的所有磁性分离过程。

4. 磁珠与目标蛋白结合

- 1) 使用 10 mL Binding/Washing Buffer 悬浮 1 g 湿重的菌体，进行破碎和裂解后得到目标粗蛋白样品。将其加入装有预处理磁珠的离心管中，并将离心管放置于漩涡混匀器中振荡 15 s。
- 2) 将离心管置于旋转混合仪上，室温下旋转混合 20~30 min；或者为了防止目标蛋白降解，也可在 2~8°C 的低温环境下旋转混合 1 h。
- 3) 将离心管进行磁性分离，将上清液移至新的离心管中备用后续检测。取下离心管，进行后续的洗涤步骤。

5. 磁珠洗涤

- 1) 向装有磁珠的离心管中加入 5-10 mL Binding/Washing Buffer，旋转混合 2 min，使磁珠重新悬浮，进行磁性分离。将清洗液移至新的离心管中备用，以备取样检测。重复洗涤步骤 1 次。
- 2) 为避免原离心管壁上的非特异性吸附蛋白污染目标蛋白，向装有磁珠的离心管中加入 5-10 mL Binding/Washing Buffer，使磁珠重新悬浮后，将磁珠悬液转移至新的离心管中，进行磁性分离，将上清液移至清洗液收集管中。

6. 目标蛋白洗脱

- 1) 根据需要确定洗脱体积以调整目标蛋白浓度，加入 2-5 mL Elution Buffer，室温旋转混合 2 min，使磁珠重新悬浮，进行磁性分离。将洗脱液收集到新的离心管中，即得到纯化的目标蛋白样品。
- 2) 为确保目标蛋白完全洗脱，可重复上述步骤 1 次，再次收集样品于新的离心管中，以检测目标蛋白是否完全洗脱。

7. 磁珠清洗和保存

- 1) NaOH 再生：蛋白洗脱后的磁珠按照以下步骤进行清洗。使用 5-10 mL 纯化水洗涤 3 次，再用 5-10 mL 0.5M NaOH 溶液洗涤 3 次，随后用 5-10 mL 纯化水洗涤至中性。最后，加入 10 mL 保存液，并将磁珠存放于 2-8°C 环境中保存。
- 2) HABA 再生：若使用脱硫生物素洗脱目标蛋白，磁珠可通过 HABA 缓冲液进行再生。加入 51-0 mL 1mM HABA 溶液洗涤磁珠 5 次，每次洗涤 5 min，随后用 Binding Buffer 洗涤磁珠至磁珠恢复其原有颜色。最后，加入 10 mL 保存液，存放于 2-8°C 环境保存。

8. 蛋白纯化流程的优化

上述操作流程适用于大多数 Strep-Tag II 标签蛋白的纯化。根据目标蛋白与 Strep-tag II 蛋白纯化磁珠的结合性能不同，用户对纯化流程进行优化，以提高目标蛋白的回收率和纯度。

A. 提高目标蛋白回收率的参考方法：

- 延长蛋白溶液与磁珠的孵育时间。
- 添加适当的蛋白酶抑制剂，防止目标蛋白降解。
- 增加磁珠的用量。
- 延长洗脱目标蛋白的时间或增加洗脱次数。

B. 提高目标蛋白纯度的参考方法：

- 添加适当的蛋白酶抑制剂，防止目标蛋白降解。
- 延长洗涤时间，增加洗涤次数。

保存条件

4°C, 2 年。

注意事项

1. 避免对磁珠进行冷冻、干燥和高速离心等操作。
2. 为了减少磁珠的损失，每次磁性分离的时间不应少于 1 min。
3. 从磁珠保存管中取出磁珠之前，应充分震荡以确保均匀悬浮。操作过程中注意避免产生气泡。
4. 建议使用质量较好的移液器吸头和反应管，以避免因磁珠和溶液附着而造成损失。
5. 磁珠与溶液混合过程中，如果溶液粘稠导致翻转离心管无法重悬磁珠，可以使用移液器吹打或瞬时漩涡混合，使磁珠充分重悬。
6. 用户可以根据实际需求保留经磁性分离后移去的上清液，并进行取样检测，以便分析纯化过程并优化蛋白纯化流程。
7. 本产品可以重复使用。当使用过的磁珠在重复使用时，建议继续纯化同种蛋白；如果要纯化不同种类的蛋白，建议使用新的磁珠。
8. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
9. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

