



Strep-tag 蛋白纯化试剂盒

货号: S1181

存储条件: 2-8°C保存, 不可冷冻。缓冲液有效期 1 年, 纯化 beads 有效期 3 年

产品简介:

本试剂盒适用于携带 Strep-tag II 与 Twin-Strep-tag 标签重组蛋白的亲纯化。

Strep-tag II 氨基酸序列: WSHHPQFEK

Twin-Strep-tag 氨基酸序列: WSHHPQFEK-GGGSGGGSGG-SA-WSHPQFEK

试剂盒预装全套实验试剂: 裂解液、结合液、预添加生物素的洗脱液、Streptactin agarose 4FF 亲和填料、重力层析空柱、溶菌酶, 可一站式完成原核表达 Strep 标签蛋白快速纯化, 操作简便, 适合重力柱常压纯化。

原理: Streptactin 与 Strep-tag II 特异性亲和; 游离生物素竞争性结合配体, 实现目标蛋白温和洗脱。

产品组成:

货号	名称	规格
S1180	TM Streptactin agarose 4FF	5ml
R1091	裂解液	100ml
S1181-C	结合液	100ml
S1181-D	洗脱液	50ml
AC003	3ml 重力空柱	10 套/包
0663	溶菌酶	100mg

操作步骤 (仅供参考):

步骤 1: 菌体裂解 (大肠杆菌样品)

1. 收集诱导表达完成的大肠杆菌菌液, 4°C, 8000 g 离心 10 min, 弃上清, 收集湿菌体;

按照 1 g 湿菌 : 5-10 mL 裂解液的比例, 用试剂盒内【裂解液】重悬菌体;

2. 每 10 mL 菌体重悬液加入 1 mg 溶菌酶 (试剂盒 0663 组分), 充分混匀;

可选: 用前加入终浓度 1 mM PMSF (PMSF 水溶液不稳定, 务必现加);

3. 冰上孵育 30-60 min, 期间每隔 10 min 颠倒混匀一次;

注: 若蛋白难裂解: 可搭配超声破碎 (冰浴超声, 防止蛋白高温变性)

4. 裂解完成后, 4°C、12000 g 离心 20-30 min; 小心吸取上层澄清上清, 弃沉淀 (包涵体 / 细胞碎片);

注: 不要吸到沉淀, 碎片会堵塞柱子、降低纯化效果! 上清尽量用 0.22 μm 滤膜过滤。

步骤 2: 层析柱与填料预处理

1. 取出 AC003 重力空柱, 用蒸馏水或乙醇溶液泡好垫片后, 将下垫片装入空柱底部。添加下堵头后在空管中加入结合缓冲液润洗空柱, 打开下端堵头, 流出保存液;

充分颠倒混匀 S1180 Streptactin agarose 4FF 填料, 吸取 2-3 mL 填料悬液装入重力柱;

2. 让柱内储存液自然流干 (液面刚好抵达填料上层表面, 不可把填料抽干干裂! 干裂会导致填料失效);

3. 加入 5 倍柱体积【结合液 (S1181-C)】平衡柱子, 液体自然流尽, 完成平衡。

注: 填料上方液体不能流干! 否则会导致填料失效

步骤 3: 样品上样结合

1. 将步骤 1 制备好的澄清菌体上清缓慢加入平衡好的层析柱;

2. 盖上柱上下盖, 可选择两种方式:

方案 A (静态结合, 推荐新手, 结合效率更高): 4°C 翻转摇床孵育 30-60 min, 随后装回重力柱, 打开下端流出液体;

方案 B (重力连续流): 控制流速, 依靠重力缓慢过柱, 整体上样时间不少于 30 min;

3. 收集流穿液 (上样后流出的液体), 保留, 后续 WB 检测判断蛋白是否结合充分。

步骤 4: 洗涤去除杂蛋白

1. 上样结束后, 加入 5-8 倍柱体积【结合液 S1181-C】洗涤填料;

2. 分 2-3 次洗涤, 每次等待液体自然流干;

3. 收集洗涤组分, 可留存用于后续电泳检测杂蛋白去除效果。

注: 若杂蛋白较多可适当增加洗涤体积; 不能使用含游离生物素的溶液洗涤!

步骤 5: 目标蛋白洗脱

1. 洗涤完成后, 加入 1-2 倍柱体积【洗脱液 S1181-D】;

封闭柱子上下端, 室温 / 冰上静置孵育 10-15 min;

打开下端堵头, 收集流出液体, 即为目标 Strep-tag II 融合蛋白;

2. 可重复洗脱 2 次, 分次收集, 提高总回收率;

注: 洗脱液内含生物素, 收集后的蛋白样品如需后续二次亲和纯化, 建议透析去除生物素。





步骤 6：填料再生与保存

1. 洗脱结束后，加入 3 倍柱体积结合液充分冲洗填料，去除残留生物素；
2. 长期保存建议置于使用含 20%乙醇的结合液重悬填料，2-8℃避光保存；
3. 若结合能力明显下降：用 3 CV 的去离子水清洗，用 5-15CV 的 20-100 mM NaOH 再生，然后用 3 CV 的去离子水清洗后保存。

注：1. 本品不适用 HABA 再生。

2. 如纯化同一蛋白，只需用 10CV 结合缓冲液清洗柱子后添加保护液保存即可；如用于不同蛋白的纯化则需要对柱子进行重生处理，对柱子清洗 3-5CV 后，可参考步骤 6 中第 3 步的操作方式再生。

常见问题排查

1、目的蛋白完全不结合填料

- 1.1 核查标签序列：确认是 Strep-tag II / Twin-Strep-tag；标签位置（N 端 / C 端）被蛋白空间结构包裹会造成结合失效；
- 1.2 上清 pH 偏离中性、样品含高浓度还原剂；
- 1.3 填料干涸失活、填料过期。

2、蛋白结合上去，但是洗脱不下来

- 2.1 洗脱液是否失效；洗脱孵育时间不足；
- 2.2 标签空间折叠紧密，可适当调整洗脱温度（室温孵育）。

3、纯化条带杂蛋白很多

- 3.1 洗涤体积不足；降低上样流速；增加洗涤次数；
- 3.2 菌体裂解上清含有大量细胞碎片，未充分离心过滤堵塞填料产生非特异性吸附。

4、柱子流速很慢、极易堵塞

- 4.1 裂解后上清没有充分澄清，残留细胞碎片；
- 4.2 操作过程填料受压压实，重力柱不要施加负压抽吸。

注意事项：

1. 溶菌酶固体粉末容易吸潮，密封 2-8℃保存；现配现用；
2. PMSF 具有毒性，操作佩戴手套；
3. 所有缓冲液避免引入游离生物素，会竞争性抑制蛋白结合；
4. 填料严禁冷冻、严禁高速剧烈离心；
5. 本试剂盒仅用于科研实验，不可用于临床诊断。

