



TMstreptactin Magnetic Beads

产品货号: S2180

储存条件: 2~8℃保存, 20%的悬浮液形式

1. 产品简介

Strep-tag 是一种在蛋白纯化系统中应用广泛的亲和标签。它包括两种类型 Strep-tagII 和 TwinStrep-tagII。Strep-tag II 是一个短肽标签, 由 8 个氨基酸 (WSHPQFEK) 组成, 可以作为 N 端或 C 端标签与蛋白质融合, 对重组蛋白的影响很小。进一步改进的 Twin Strep-tag II 是一个顺序排列的两个 Strep-tagII 序列 (通过内部氨基酸连接), 该标签能够像 Strep-tagII 一样进行温和、快速的纯化。

Strep-tag 标记技术可用于从各种表达系统中纯化功能性链球菌标记蛋白, 包括杆状病毒、哺乳动物细胞、酵母和细菌。该技术可耐受不同的缓冲条件和添加剂(高盐、洗涤剂、还原剂、金属离子和螯合剂), 普遍适用于大部分蛋白质性质, 而且便于蛋白质和蛋白质质检相互作用分析。一般来说, 上述两种标签都不干扰目标蛋白的折叠或生物活性, 不与重金属离子反应, 不具有离子交换特性, 也不会引起蛋白质聚集。因此, 纯化后无需去除 Strep-tagII 和 TwinStrep-tagII。

TMstreptactin Magnetic Beads 的配体蛋白是 Streptavidin 的突变体, 其偶联至高度交联的 4%琼脂糖微球上。样品中低浓度(50μmol/L)的 D-生物素不会影响目的蛋白和 TMstreptactin Magnetic Beads 的结合效果。该产品在使用后可用平衡液再生, 或者使用 10mM NaOH 进行一定程度的清洗。

2. 技术指标

产品名称	TMstreptactin Magnetic Beads
基质	磁性琼脂糖珠
配基	链霉亲和素
颗粒范围(um)	30-100
载量	3-5mg 蛋白/ml 介质
产品体积	磁珠体积占悬浮液体积的 20%

3. 操作步骤 (供参考)

3.1 缓冲液准备

水、缓冲液在使用之前建议用 0.22μm 或 0.45μm 滤膜过滤使用。

平衡/洗杂液: 100mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, pH8.0

或 PBS: 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, 136mM NaCl, 2.6mM KCl, pH7.4

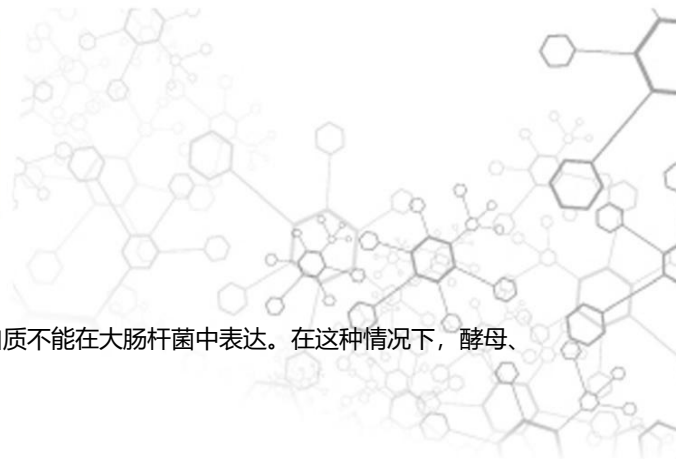
洗脱液: 平衡液中加入 1-5mM D-生物素

再生液: 10mM NaOH

3.2 菌体培养操作步骤如下:

- 1) 挑取含有表达质粒的菌落接种于 4ml 含有 50μg/ml Kana 的 LB 培养基中, 37℃振荡培养 8h, 转速 200rpm。
- 2) 取 1ml 初始培养菌液接种到 1L 含有 50μg/ml Kana 的 LB 培养基中, 37℃振荡培养, 转速 200rpm。
- 3) 检测 600nm 处吸收值, 当 OD₆₀₀=0.5-0.6 时, 加入 100μl 诱导剂, 16℃振荡培养 16h, 转速 200rpm。





4) 5000 rpm (3800×g) , 离心 10min, 弃去培养基, 保留沉淀。

注: 1.细菌表达具有获得表达产物时间短、成本低的优点, 但是有些蛋白质不能在大肠杆菌中表达。在这种情况下, 酵母、昆虫、哺乳动物或植物细胞可作为替代表达宿主。

3.3 菌体裂解液的准备

1) 称取菌体质量, 按照菌体: 平衡液=1: 10 (W/V) 溶解。

2) 冰上超声破碎细胞, 至菌液基本保持澄清。

3) 取两个 10μl 破碎后样品, 其中一个离心分离沉淀和上清, 三个样品中分别加入 10μl 2XSDS-PAGE Loading Buffer, 电泳鉴定目的蛋白可溶性。

4) 如果裂解液特别粘稠, 可在每毫升菌体裂解液中加入 1-2μl 超级核酸酶, 室温孵育 30min。

5) 10,000rpm(15,000×g), 4℃离心 20-30 min。

6) 将上清转移至干净的容器中。如果重组蛋白表达成包涵体, 目的蛋白将在沉淀中。

注: 高浓度的游离生物素会影响介质和目的蛋白的结合, 可以通过透析、硫酸铵沉淀或者交叉流浓缩/过滤去除样品在上样前建议离心或用 0.22μm 滤膜过滤, 减少杂质, 提高蛋白纯化效率。

3.4 孵育法纯化

1) 根据纯化的样品量, 取适量 TMstreptactin Magnetic Beads 加入离心管中, 利用磁分离吸附珠子, 等上清清澈后吸弃上清; 也可加入重力柱中, 流干保护液。

2) 向离心管中加入 5 倍介质体积的平衡液清洗介质, 利用磁分离吸附珠子等上清清澈后吸弃上清; 如使用重力柱, 则直接在重力柱中清洗, 直接重力流干平衡液; 重复两次以上。

3) 加入样品, 封闭离心管或重力柱管, 4℃振荡孵育 2-4h 或者 37℃孵育 30min-2h。

4) 孵育结束后, 利用磁分离吸附珠子等上清清澈后吸弃上清, 保留部分上清作为流穿, 用于电泳鉴定。

5) 用 5 倍介质体积的洗杂液清洗介质, 利用磁分离吸附珠子等上清清澈后吸弃上清 (注意不要吸到介质, 保留部分上清用于电泳鉴定), 重复 3-5 次, 中间建议更换新离心管。

6) 加入 3-5 倍柱体积的洗脱液进行洗脱, 室温孵育 5min, 利用磁分离吸附珠子等上清清澈后吸弃上清或重力柱管收集洗脱液, 可重复 2-3 次。

