

使用说明书

【产品名称】 GSH 琼脂糖磁珠

【产品型号】 MAg25K/GSH

【目录号】 P22

【产品介绍】

Enriching Beads® GST 融合蛋白纯化磁珠以磁性交联琼脂糖为基质，表面共价偶联 GSH 配基，可快速纯化谷胱甘肽巯基转移酶(GST)融合蛋白。与传统的柱层析纯化方式相比，采用 GSH 琼脂糖磁珠，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，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 小时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，为科研工作者节省了时间和成本。

【产品规格】

平均粒径	25 μ m
GSH 配基含量	30~40 μ mol/mL(100%,v/v)
固形物浓度	10% (v/v)
分散液	20% ethanol
目标蛋白结合量	8mg/mL beads(100%,v/v)

【产品特点】

- ◇ 磁性分离速度快；
- ◇ 结合载量高；
- ◇ 非特异性吸附低。

【作用对象】 细菌，酵母，昆虫和哺乳动物细胞等分泌或胞内表达的 GST 融合蛋白。

【保存条件】 长期保存建议 20%乙醇，2°C~8°C；请勿冻融使用。

【磁珠备注】

- 1: 1mL 磁珠悬浮液中包含 100 μ L 体积的磁珠；
- 2: 磁珠与蛋白结合量与目标蛋白特性有关，此处仅作参考值；
- 3: 磁珠使用和保存过程中应避免反复冻融，且不可以干燥；
- 4: 本产品可重复使用，若纯化不同种类蛋白时，建议使用新的磁珠。

【操作流程】

1. 材料和试剂准备

1.1 离心管，磁力架，旋转混合仪或涡旋混合仪；

1.2 缓冲液的准备：

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纯化效率。因此，在较大规模蛋白纯化之前，用户应该自行设计实验，筛选出适合纯化目标蛋白的缓冲液体系，主要包括Binding Buffer、Wash Buffer、Elution Buffer。

Binding/Wash Buffer: 140mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄, pH7.4

Elution Buffer: 50mM Tris-HCl, 10mM 还原型谷胱甘肽, pH8.0；配制方法：0.1M Tris溶液50mL，0.3g还原型谷胱甘肽，调节pH至8.0，用水定容至100mL。

注：1. 还原型谷胱甘肽容易被氧化，Elution Buffer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10mM还原型谷胱甘肽的Elution Buffer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Elution Buffer中还原型谷胱甘肽的浓度；

2. 样品处理

2.1 高速离心收集大肠杆菌、酵母或细胞等；

2.2 向上述的细胞沉淀中加入适量体积的 Binding Buffer，以及蛋白酶抑制剂（如终浓度为1mM的PMSF），重悬细胞，冰浴超声或者高压破碎裂解细胞，后得到粗蛋白样品。

3. 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表达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，250mL 发酵液收获 1g 湿重的菌体，通过预实验估算其目标蛋白表达量为 5~10mg，用户需要取 10mL 磁珠悬浮液用于目标蛋白的纯化。以下即以此为例进行详细说明：

3.1 将 GST 融合蛋白纯化磁珠充分混匀，移取 10mL 磁珠悬浮液到离心管中，磁性分离去除上清液；

3.2 加入 10mL Binding Buffer，充分混匀磁珠，磁性分离去除上清液（2次）。

4. 目标蛋白纯化

4.1 将粗蛋白样品（步骤2样品处理得到）加入到步骤3中装有预处理磁珠的离心管中，盖紧离心管盖；

4.2 将离心管放置于旋转混合仪上，室温旋转孵育 30min（如有需要可在 4℃下旋转混合

1h 以上，防止蛋白降解）；

4.3 将离心管置于磁力架上进行磁性分离，移出上清液到新的离心管中以备后续检测，从磁力架上取下离心管进行后续洗涤步骤。

5. 清洗

5.1 加入 10mL Wash Buffer 到装有磁珠的离心管中，旋转混合 1~2min，磁性分离，吸取上清液到新的离心管中，以备取样检测，清洗 3~4 次。

6. 目标蛋白洗脱

6.1 加入 2~5mL Elution Buffer（用户可根据需要改变洗脱体积从而调整目标蛋白浓度）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 5min，磁性分离，收集上清液到新的离心管中，得到纯化的目标蛋白样品；

6.2 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。

7. 磁珠清洗和保存

7.1 使用过的磁珠经过简单清洗处理后，可再次用于纯化操作，也可分散到 20% (v/v) 乙醇溶液，至于 2~8℃ 长时间保存；

7.2 若重复使用次数较多，由于沉淀，变形或非特异性吸附蛋白累积，导致磁珠结合目标蛋白的能力明显下降。可按下面的方法进行洗涤：

①用 10~20mL 20%乙醇清洗三次，每次清洗 1min，磁性分离，去除上清液；

②用 10~20mL PBS 清洗三次，去除上清液，重新分散于 20%乙醇中，置于 2~8℃ 保存；

【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。

提高目标蛋白回收率的参考方法

1. 延长粗蛋白与磁珠的孵育时间；
2. 样品及缓冲液中加入 1~10mM 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 Elution Buffer，保证目标蛋白洗脱效率。

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%Tween20 或 0.2%NP-40 可降低非特异蛋白的吸附；
4. 延长洗涤的时间，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。

【其它】

该产品可配合英芮诚核酸提取仪（订货号 ETP-32）进行自动化操作，也可以配合多功能磁力架（订货号 CQT-0011）、16 位磁力架（订货号 CQT-0001）、手动磁性萃取指套（订货号 CQT-0008）进行手动操作。

【注意事项】

1. 首次使用本产品前，请务必详细阅读本用户手册；
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. 请选用高品质的移液器吸头和离心管，以免磁珠贴壁或混合过程中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打或短时涡漩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. 本产品需与磁性分离器配套使用；
8. 本产品在 2~8℃可稳定保存，保质期两年；
9. 本产品仅供研究使用。

地址：上海市杨浦区翔殷路 128 号 1 号楼 B 座 301 室

电话：021-55809378

网址：www.bio-enriching.com

电子邮件：marketing@bio-enriching.com

版权声明：© 苏州英芮诚生化科技有限公司保留本使用说明书的所有权利。版本：V.170102