



GST Magnetic Beads

产品信息:

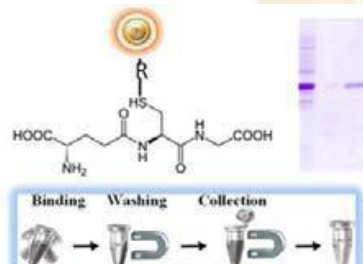
货号	规格
MG-103	1ml (20mg/ml)

产品介绍:

GST Magnetic Beads 是 $1\mu\text{m}$ 大小均匀的, 表面包覆有高密度谷胱甘肽的二氧化硅基质超顺磁磁珠。这种磁珠是特定设计主要用于免疫沉淀反应, 或者快速, 一步法纯化带有 GST-标签的重组蛋白, 纯化过程大约需要 15-25 分钟。

产品特点:

- 快捷, 简单的一步法高通量操作, 无需纯化柱或过滤器, 或重复移液、离心等操作 (图 1)
- 高结合能力
- 极低的非特异性结合率
- 成本低: 只有市场同类磁珠产品价格的一半
- 对样本体积要求低, 便于自动化操作



组成	二氧化硅包覆氧化铁磁珠, 表面连接有谷胱甘肽
磁珠大小	直径 $1\mu\text{m}$ - $10\mu\text{m}$
磁珠数	$\sim 1.7 \times 10^8$
磁化强度	$\sim 40 \text{ EMU/g}$
磁化类型	超顺磁性
有效密度	2.5 g/ml
浓度	20 mg/ml (1x PBS, 20% Ethanol)
结合力	$>1 \text{ mg GST 重组蛋白/ ml of Beads}$
存储	4°C 保存

缓冲液成分:

· GST Magnetic Beads (悬浮在 $0.05 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7.5, 0.15 M NaCl , $0.01\% \text{ NaN}_3$ 缓冲液中)

·1x Binding/Washing Buffer (0.14 M NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 2.7 mM KCl, pH 7.5)

·1x Elution Buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0)

注意事项: Dissolve 100 mg Glutathione (reduced) in 10 ml of 1x Elution Buffer. Prepare fresh.

·PBS Buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.5)

所需耗材

磁力分离器 (适用于手动操作): 根据实验时生物样品的体积, 使用者可以选择一下不同型号的磁力分离器: 本公司 CZ402-01 可以容纳 8 个单独的 1.5 ml 离心管; CZ402-02 可以容纳 24 个单独的 1.5 ml 离心管; CZ402-03 和 96 孔深孔板配合使用; CZ402-04 可以容纳 4 个单独的 15 ml 离心管; CZ402-05 可以容纳 4 个单独的 50 ml 离心管。

操作过程

注意事项:

设计一个用于纯化 DNA 或 RNA 的通用操作流程相对简单, 因为核酸具有相对一致的生化特性。然而, 设计一个用于蛋白质纯化的通用试剂盒是非常困难的, 因为每种蛋白质具有不同的组成和结构。为了获得最佳实验结果, 每个用户必须确定需要纯化的融合蛋白的最佳纯化条件。

在纯化 GST 标记的融合蛋白之前, 应将所需使用的试剂温度调剂到室温。

A. 细胞提取物的制备

1. 将细胞培养液以 10000 x g 离心 6 分钟, 完全去除上清后收集细胞体, 并在 -80°C 下冷冻放置 1 小时。

2. 在冰块上解冻细胞, 并且每 50 毫升细胞培养物用 3ml 的 1x Binding/ Washing Buffer 重新悬浮细胞。在冰上通过短暂的超声破碎细胞, 直到样品不再粘稠。同时避免样品被加热。

注意: GST 标签与磁珠的结合不受 1% Triton X-100、1% Tween-20、1% CTAB、10 mM DTT、0.03% SDS 或 0.1% NP-40 的影响。而且, 这些化学物质可能会减少非特异性结合概率。

3. 以 10000 x g 离心 6 分钟, 小心地将上清液转移到干净的预冷管中, 并将沉淀按照每 50ml 培养物加入 3ml 1x Binding /Washing 缓冲液方式重新悬浮。

4. 分别从上清液和沉淀液中吸取 10μl 样品, 加入等体积的 2x SDS 加样缓冲液, 煮沸 5 分钟, 使用 SDS-PAGE 测定融合蛋白的总量和溶解度。

注意: 如果 GST 融合蛋白形成包涵体 (不溶性蛋白), 则包涵体必须在纯化前适当溶解和重新折叠。

B. 在自然条件下纯化重组 GST 标签融合蛋白

1. 震荡装有磁珠的试剂瓶, 直到磁珠完全悬浮, 然后将适量的磁珠转移到新的试管中。

注意: 这一点非常重要, 用户应根据粗样品中 GST 标记融合蛋白的数量, 根据经验确定用于每次纯化的最佳磁珠数量。过多的磁珠会导致更高的背景; 磁珠太少会导致产量下降。

所以，我们建议从每 0.1mg 重组 GST 标签融合蛋白加 100 μ l 完全悬浮磁珠开始纯化。

2. 将试管置于磁力分离器中，等待 2-3 分钟，直到上清液完全澄清。吸出上清液，从磁力分离器上取下单管，用 4 倍体积的 1x Binding /Washing 缓冲液重新悬浮磁珠。

3. 重复步骤 2 一次。

4. 将试管放入磁力分离器中，待上清液澄清后丢弃上清液。用 1 倍体积的 1x Binding /Washing 缓冲液重新悬浮磁珠。

5. 将制备好的细胞提取物与磁珠混合，通过多次颠倒充分混合，并在连续旋转的情况下混匀 10-20 分钟。将试管放入磁力分离器中，保存一小部分上清液并丢弃剩余部分。

注意：保留一份上清液供进一步分析，因为某些蛋白质可能不会与磁珠结合。

6. 通过添加 8 倍体积的 1x Binding /Washing 缓冲液清洗磁珠，并通过移液器多次吹吸重新悬浮磁珠。再次将试管放入磁力分离器中，然后吸出试管上清液。

7. 用 8 倍体积的 1x Binding /Washing 缓冲液充分清洗磁珠，直到洗脱液在 280 nm 处的吸光度接近背景水平 (OD 280<0.05)。(注意：这一步对于获得高纯度蛋白质非常重要。)

8. 从磁力分离器上取下试管，向试管中加入所需体积的 1x Elution Buffer 缓冲液，从磁珠上洗脱结合蛋白。通过多次吹吸，将磁珠重新充分悬浮，并在室温下涡旋震荡 5 分钟充分混匀。将管放入磁力分离器中，小心地将上清液转移到干净的试管中。

9. 重复步骤 8 一次。

10. 分别从上述步骤 5 中吸取的上清液和步骤 8 中吸取的蛋白洗脱液中吸取 10-20 μ l 液体，并进行 SDS-PAGE 分析，以确认目标蛋白的存在。

C. 磁珠的再生和储存

注意：如果目标 GST 融合蛋白相同，则磁珠可重复使用三次而无需再生。但是，如果目标 GST 融合蛋白不同或磁珠结合能力下降，则必须根据以下条件再生磁珠：

1. 使用 10 倍体积的再生缓冲液 I (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M NaCl) 清洗磁珠，并用上述的磁力分离器分离上清液。

2. 使用 10 倍体积的再生缓冲液 II (100 mM 醋酸钠, pH 4.5, 0.5 M NaCl) 清洗磁珠，并用磁力分离器分离上清液。

3. 通过添加 10 倍体积的 1x Binding /Washing 缓冲液，快速平衡磁珠。对于长期储存，磁珠应储存在 4 $^{\circ}$ C 的 20% 乙醇中。

D. 常见问题

问题 1：纯化的融合蛋白产率低或无法检测到。

可能原因：

1. 重组蛋白形成包涵体

建议：

(1) 在 14 $^{\circ}$ C 环境培养菌体。

(2)将 IPTG 的最终浓度降低至 0.1mM 以进行蛋白质诱导。

(3)减少蛋白诱导时间。

(4)纯化前正确破碎包涵体。

2. 该融合蛋白不含有活性 GST 标签

建议：尝试使用其他融合蛋白的纯化方式，例如 His 标签。重新编码目标蛋白的纯化标签。

3.过度的超声破碎，使蛋白变性。 建议：尽量使用温和的超声波条件或其他方法，如溶菌酶。

4.融合蛋白不与磁珠结合

建议：

(1)在细胞裂解之前，在结合缓冲液中添加最终浓度为 5 mM 的 DTT。

(2) 检查结合缓冲液的 pH 值（pH 值应为 6.5-8.0）。

5. 融合蛋白不能有效地从磁珠中洗脱。

建议：

(1)提高洗脱时间。

(2)将洗脱缓冲液中的谷胱甘肽浓度增加至 15mM 或更高。（请检查最终 pH 值，必要时进行调整。）

(3)在不增加谷胱甘肽浓度的情况下，将洗脱缓冲液的 pH 值调整至 8.0-9.0。

(4)在洗脱缓冲液中添加最终浓度为 0.1% Triton X-100 或最终浓度为 0.1-0.2 M NaCl。

问题 2. 在洗脱蛋白中观察到多条带

可能原因：

1.融合蛋白降解

建议：

(1)添加适量的蛋白酶抑制剂。

(2)使用蛋白酶缺陷表达宿主。

2. 一些宿主蛋白，如伴侣蛋白，可能与融合蛋白相互作用。

建议：

(1)在洗脱缓冲液中加入最终浓度为 5 mM DTT。

(2)纯化前，在 37°C下将重组蛋白溶液在伴侣蛋白缓冲液（2 mM ATP、10 mM MgSO₄、50 mM Tris-HCl）中温浴 10 min。

3. 过度超声处理会导致一些蛋白质与融合蛋白结合。

建议：使用温和的超声条件或其他溶解方法。