

Strep-tag II 标签蛋白纯化琼脂糖微球

1. 产品介绍

Strep-tag II 标签蛋白纯化琼脂糖微球 可用于从任何表达系统包括杆状病毒、哺乳动物细胞、酵母和细菌中纯化 Strep-tag II 和 Twin Strep-tag II 蛋白。

Strep-tag II 是一个由 8 个氨基酸 (Trp-Ser-His-Pro-Gln- Phe-Glu-Lys) 构成的短序列, 对重组蛋白的影响可以忽略不计, 因此无需去除该 tag。进一步改进的 Twin Strep-tag II 是一个顺序排列的两个 Strep-tag II 序列 (通过内部氨基酸连接), 该标签能够像 Strep-tag II 一样进行温和、快速的纯化。Streptactin 是最稳定的蛋白之一, 其偶联至高度交联的 4% 琼脂糖微球上, 使得融合蛋白在生理条件下亲和纯化, 保证了蛋白质的生物活性。具体性能见表 1。**Strep-tag II 标签蛋白纯化琼脂糖微球** 具有较高的耐受性, 可以多次使用, 见表 2。

表 1. **Strep-tag II 标签蛋白纯化琼脂糖微球** 产品性能

项目	性能
基质	高度交联的 4% 琼脂糖微球
配体	Streptactin
载量	3-5mg Twin Strep-tag II 蛋白/ml 介质
粒径	45-165µm
最大流速	300cm/h
储存缓冲液	含 20% 乙醇 1XPBS
储存温度	2 - 8°C

表 2. **Strep-tag II 标签蛋白纯化琼脂糖微球** 耐受性

试剂	浓度
Reduction Agents	
DTT	50 mM
β-mercaptoethanol	50 mM
Non-Ionic Detergents	
C ₈ E ₄ ; Octyltetraoxyethylene	Max.0.88%
C ₁₀ E ₅ ; Decylpentaoxyethylene	0.12%
C ₁₀ E ₆	0.03%
C ₁₂ E ₈	0.005%
C ₁₂ E ₉ ; Dodecyl nonaaxyethylene (Thesit)	0.023%
DM; Decyl-β-D-maltoside	0.35%
LM; N-dodecyl β-D-maltoside	0.007%
NG; N-nonyl-β-D-glucopyranoside	0.2%
OG; N-octyl-β-D-glucopyranoside	2.34%
TX; Triton X-100	2%
Tween 20	2%
Ionic Detergents	
N-lauryl-sarcosine	2%
8-HESO; N-octyl-2-hydroxy-ethylsulfoxide	1.32%
SDS; Sodium-N-dodecyl sulfate	0.1%
Zwitter-Ionic Detergents	
CHAPS	0.1%
DDAO; N-decyl-N,N-dimethylamine-N-oxide	0.034%
LDAO; N-dodecyl-N,N-dimethylamine-N-oxide	0.13%

其它

Ammonium sulfate (NH ₄) ₂ SO ₄	2M
CaCl ₂	Max.1M
Ethanol	10%
EDTA	50mM
Guanidine	Max.1M
Glycerol	Max.25%
Imidazole	Max.250mM
MgCl ₂	1M
NaCl	5M
Urea	Max.1M

2. 纯化流程

2.1 缓冲液的准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22μm 或 0.45μm 滤膜过滤。

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

或 PBS: 20 mM sodium phosphate, 280 mM NaCl, 6 mM potassium chloride, pH7.4

洗脱液: 平衡液中加入 2.5 mM 脱巯生物素或 D-生物素

再生液: 1M NaOH 或平衡液中加入 1mM HABA

注: D-生物素与 Streptactin 结合非常紧密, 高浓度氢氧化钠清洗后载量只能达到初始载量的 50% 左右。

2.2 样品准备

样品在上样前建议离心或用 0.22μm 或 0.45μm 滤膜过滤, 减少杂质, 提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

2.3 Strep-tag II 标签蛋白纯化琼脂糖微球 装填

2.3.1 重力柱的装填

- 1) 取合适规格的重力层析柱, 装入下垫片, 加入适量纯水润洗柱管和垫片, 关闭下出口。
- 2) 将 **Strep-tag II 标签蛋白纯化琼脂糖微球** 混合均匀, 用枪头吸取适量浆液加入至重力柱中(介质实际体积占悬液的一半), 打开下出口流干保护液。
- 3) 加入适量纯水冲洗介质, 待柱管中液体重力流干后, 关闭下出口。
- 4) 装入润洗后的上垫片, 确保垫片与填料之前没有空隙, 且保持水平。
- 5) 装填好的重力柱可以直接加入平衡液进行平衡, 暂不使用时则加入保护液, 2-8℃ 保存。

2.3.2 中压层析柱的装填

Strep-tag II 标签蛋白纯化琼脂糖微球 被广泛应用于工业纯化, 因此, 涉及到各种中压色谱层析柱的填装, 下面介绍填装层析柱的方法。

装柱前根据层析柱直径计算柱子底面积, 根据所需装柱高度计算所需介质体积, 公式如下:

$$V = 1.15\pi r^2 h$$

V: 所需介质体积 ml

1.15: 压缩系数

r: 柱管半径 cm

h: 装填高度 cm

注意: 所取悬液体积应为介质体积的两倍, 因为介质体积只占悬液总体积的一半, 另一半为保护液。

- 1) 用去离子水冲洗层析柱底筛板与接头, 确保柱底筛板上无气泡, 关闭柱底出口, 并在柱底部留出 1-2cm 的去离子水。
- 2) 将介质悬浮起来, 小心的将浆液连续地倒入层析柱中。用玻璃棒沿着柱壁倒入浆液可减少气泡的产生。
- 3) 如果使用储液器, 应立即在层析柱和储液器中加满水, 将进样分配器放置于浆液表面, 连接至泵上, 避免在分配器或进样管中产生气泡。
- 4) 打开层析柱底部出口, 开启泵, 使其在设定的流速下进行。最初应让缓冲液缓慢流过层析柱, 然后缓慢增加至最终流速, 这样可避免液压对所形成柱床的冲击, 也可以避免柱床形成的不均匀。如果达不到推荐的压力或流速, 可以用你所使用泵的最大流速, 这样也可以得到一个很好的装填效果。(注意: 在随后的色谱程序中, 不要超过最大装柱流速的 75%) 当柱床高度稳定后, 在最后的装柱流速下至少再上 3 倍柱床体积的去离子水。标上柱床高度。

- 5) 关闭泵，关闭层析柱出口。
- 6) 如果使用储液器，去除储液器，将分配器置于层析柱中。
- 7) 将分配器推向柱子至标记的柱床高度处。允许装柱液进入分配器，锁紧分配器接头。
- 8) 将装填好的层析柱连接至泵或色谱系统中，开始平衡。如果需要可以重新调整分配器。

2.4 样品纯化

2.4.1 孵育法纯化

- 1) 根据纯化样品量，取适量 **Strep-tag II 标签蛋白纯化琼脂糖微球** 加入离心管中，1000rpm 离心 1min，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，1000rpm 离心 1min，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-2 h。
- 4) 孵育结束后，1000rpm 离心 1min，吸弃上清，或过滤收集介质，上清保留作为流穿，用于电泳鉴定。
- 5) 用 5 倍介质体积的洗杂液清洗介质，1000rpm 离心 1min 或重力柱管过滤，去除上清（注意不要吸到介质），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，1000 rpm 离心 1min 或重力柱管收集洗脱液，可重复 2-3 次。

2.4.2 重力柱法纯化

- 1) 将装填好的 **Strep-tag II 标签蛋白纯化琼脂糖微球** 重力柱用 5 倍柱体积平衡液进行平衡，使填料处于与目的蛋白相同的缓冲液体系下，重复 2-3 次。
- 2) 将样品加到平衡好的重力柱中，样品保留时间至少 2 min，保证样品和介质充分接触，收集流出液，可以反复上样增加结合效率。
- 3) 用 10-15 倍柱体积的洗杂液进行洗杂，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液。
- 4) 使用 5-10 倍柱体积的洗脱液洗脱，分段收集，每一个柱体积收集一管，分别检测，既可以保证所有结合的目的蛋白被洗脱，又可以得到高纯度和高浓度的蛋白。

2.4.3 中压层析柱法纯化

Strep-tag II 标签蛋白纯化琼脂糖微球 装填好后，可以用各种常规的中低压色谱系统。

- 1) 将泵管道中注满去离子水。去掉上塞子，将层析柱连接至色谱系统中，打开下出口，将预装柱接到色谱系统中，并旋紧。
- 2) 用 3-5 倍柱体积的去离子水冲洗出储存缓冲液。
- 3) 使用至少 5 倍柱床体积的平衡液平衡色谱柱。
- 4) 利用泵或样品环上样。**注：**样品的粘度增加使得即使上样体积很少，也会导致层析柱很大的反压。上样量不要超过柱子的结合能力。大量的样品体积也可能造成很大的反压，使得进样器更难使用。
- 5) 用洗杂液冲洗柱子，直到紫外吸收达到一个稳定的基线（一般至少 10-15 个柱体积）。
- 6) 使用 5-10 倍柱体积的洗脱液洗脱，收集洗脱液，即目的蛋白组分。

介质洗脱结束后，用平衡液冲洗 5-10 柱体积，然后用纯水冲洗 5-10 个柱体积，再用 20%乙醇冲洗 2 个柱体积，置于 2-8℃保存。

2.5 SDS-PAGE 检测

将使用纯化产品得到的样品（包括流出组分、洗杂组分和洗脱组分）以及原始样品使用 SDS-PAGE 检测纯化效果。

3. 填料再生和清洗

再生：洗脱液为脱硫生物素时，用 5 倍柱体积（CV）的去离子水清洗，用 15 倍柱体积的含 1mM HABA 的平衡液再生，然后用 30 倍柱体积的平衡液清洗。脱硫生物素被黄色溶液 HABA 取代，后者一旦与 Streptactin 复合即变为红色。HABA 随后被平衡液除去，柱子可被重新使用。

洗脱液为 D-生物素时，用 5 倍柱体积（CV）的去离子水清洗，用 15 倍柱体积的 1M NaOH 再生，然后用 30 倍柱体积的平衡液清洗。

保存：填料再生清洗后保存在等体积的保护液中，置于 2-8℃保存，防止填料被细菌污染。

本产品仅用于生命科学研究，不得用于医学诊断及其它用途！