



mich® Beads GSH GST 融合蛋白纯化磁珠

使用说明书 (Ver.1.0)

保定米奇生物科技有限公司
Mich Scientific Co., LTD

0312-5905689
info@michlab.cn
www.michlab.cn

目 录

产品简介	3
产品信息	3
适用范围	3
操作流程	3
1. 缓冲溶液配制	4
2. 样品处理	4
3. 磁珠预处理	4
4. 目标蛋白与磁珠结合	5
5. 磁珠洗涤	5
6. 目标蛋白洗脱	5
7. 磁珠清洗和保存	5
蛋白纯化流程的优化	6
注意事项	7
产品列表	7

产品简介

GST 融合蛋白纯化磁珠是专为高效、快速纯化谷胱甘肽巯基转移酶（GST）融合蛋白而设计的一种新型功能化材料，可通过磁性分离方式从生物样品中一步纯化出高纯度的目标蛋白，简化纯化工艺和提高纯化效率，适合科研和工业领域便捷地进行 GST 融合蛋白的纯化。

与传统的柱层析纯化方式相比，采用本磁珠纯化 GST 融合蛋白，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、无需控制流速、无需昂贵的层析设备。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，1 h 内就能获得高纯度目的蛋白，并且能轻松实现高通量和大规模样品的平行处理。

产品信息

产品名称	mich® Beads GSH
磁珠粒径	30 μm ~ 150 μm
GSH 配基含量	20 ~ 30 μmol/mL (100% 磁珠)
GST 融合蛋白结合量 ¹	≥ 5 mg/mL (100% 磁珠)
悬液浓度 ²	10% (V/V) 磁珠悬液
保存液	20% (V/V) 乙醇
化学稳定性	常温可耐受 70% 乙醇、6 M 盐酸胍、0.1 M 氢氧化钠、0.1 M 醋酸 1 h
保质期	在 2 ~ 8°C 可稳定保存，保质期 2 年

注 1: 磁珠蛋白结合量与目标蛋白特性相关，此处仅做参考值。

注 2: 1 mL 磁珠悬液中含有 100 μL 磁珠。

适用范围

适用于谷胱甘肽巯基转移酶（GST）融合蛋白、谷胱甘肽转移酶以及与谷胱甘肽有亲和作用的其它蛋白的分离纯化。

操作流程

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回收率和纯度。因此，在较大规模蛋白纯化之前，用户应该自行设计实验，筛选出适合目标蛋白的缓冲液，包括 Binding/Washing Buffer (*Buffer A*) 及 Elution Buffer (*Buffer B*)。以下提供一个较强结合力的 GST 标签蛋白的纯化流程，供用户参考。

1. 缓冲溶液配制

Buffer A : 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH7.4

Buffer B*: 50 mM Tris-HCl, 10 mM 还原型谷胱甘肽, pH8.0

***Buffer B 配置方法:** 0.1 M Tris 溶液 50 mL, 0.307 g 还原型谷胱甘肽, 然后用 0.1 M 盐酸调 pH 到 8.0, 加去离子水定容至 100 mL。

注: 可等比例放大缩小。

- 注: 1) 还原型谷胱甘肽容易被氧化, Buffer B 要求现配现用 (请按需溶解, 防止氧化, 请勿一次性全部溶解)。
- 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 10 mM 还原性谷胱甘肽的 Buffer B 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 Buffer B 中还原型谷胱甘肽的浓度。
- 3) Buffer A 和 Buffer B 中可以添加 1 ~ 5 mM EDTA、1 ~ 10 mM DTT 和 0.1 ~ 1.0% Triton X-100 (或 0.1 ~ 1.0% Tween-20), 以提高目标蛋白的稳定性。

2. 样品处理

本《使用说明书》提供以下三种样品的处理方法:

- (1) 大肠杆菌、酵母等细胞内表达蛋白:** 表达细胞用适量 Buffer A 稀释, 加入蛋白酶抑制剂 (如终浓度为 1 mM 的 PMSF)。冰浴超声裂解细胞, 即为粗蛋白样品。如果样品过于粘稠, 可以根据需要在粗样品中加入适量核酸酶, 在冰上放置 30 min, 以降解核酸。如果目标蛋白含量较低, 建议将粗蛋白样品进行离心操作。
- (2) 胞外表达蛋白:** 取胞外表达上清, 用等量 Buffer A 稀释平衡, 即为粗蛋白样品。
- (3) 动物细胞内表达蛋白:** 取适量动物细胞, 用适量 PBS 洗涤 1 次, 弃上清; 用适量含 1% (V/V) Triton X-100 或 1% (V/V) NP-40 的 Buffer A 重悬; 加入蛋白酶抑制剂 (如终浓度为 1 mM 的 PMSF); 置于冰上 10 min, 即为粗蛋白样品。

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产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, 250 mL 发酵液收获 1 g 湿重的菌体, 通过预实验估算其目标蛋白产量为 5 ~ 10 mg, 用户需要取 10 mL 10% 的磁珠悬液用于目标蛋白的纯化。以下举例详细说明:

- (1)** 将磁珠产品置于漩涡混匀器上充分混匀, 用移液器取 10 mL 磁珠悬液于离心管中。
- (2)** 将离心管置于磁性分离器上, 待溶液变澄清后, 移去上清液。
- (3)** 加入 5 ~ 10 mL Buffer A 到上述装有磁珠的离心管中, 盖紧盖子, 漩涡振荡 15 s, 使磁珠重新悬浮。将离心管置于磁性分离器上, 磁性分离 *, 移去上清液, 重复洗涤 2 次。

*注：在磁性分离过程中，为了减少磁珠在使用过程中的损耗，待溶液变澄清后，盖紧离心管盖子，保持离心管仍在磁性分离器上，手持磁性分离器与离心管上下翻转数次，使澄清的溶液涮洗离心管盖上残留的磁珠，静置片刻，使溶液重新变澄清；以下同。

4. 目标蛋白与磁珠结合

- (1) 用 10 mL Buffer A 悬浮 1 g 湿重的菌体，进行破碎和裂解后，即为粗蛋白样品。
- (2) 将粗蛋白样品加入到装有预处理磁珠的离心管中，盖紧离心管盖。
- (3) 将离心管置于漩涡混匀器振荡 15 s，然后置于旋转混合仪上，室温旋转混合 20 ~ 30 min (如果需要，可在 2 ~ 8°C 的低温环境下旋转混合约 1 h，防止目标蛋白降解)。
- (4) 将离心管置于磁性分离器上进行磁性分离，移出上清液到新的离心管中以备后续检测。从磁性分离器上取下离心管进行后续洗涤步骤。

5. 磁珠洗涤

- (1) 加入 5 ~ 10 mL Buffer A 到装有磁珠的离心管中，旋转混合 2 min，磁性分离，移出清洗液到新的离心管中，以备取样检测。
- (2) 加入 5 ~ 10 mL Buffer A 到装有磁珠的离心管，使磁珠重新悬浮，将磁珠悬液转移至新的离心管，避免原离心管壁上非特异性吸附蛋白污染目标蛋白；磁性分离，移出上清液到清洗液收集管。

6. 目标蛋白洗脱

- (1) 加入 2 ~ 5 mL Buffer B (用户可根据需要改变洗脱体积调整目标蛋白浓度) 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 2 min；磁性分离，收集洗脱液到新的离心管中，即为纯化的目标蛋白样品。
- (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

磁珠使用后经过简单清洗处理后，可以继续用于后续的纯化操作，也可以长时间保存。用户可根据磁珠使用的情况选择不同的清洗方法，主要有以下几种情况：

情况 1：重复使用次数较少，结合能力下降不明显时，可以采用高 pH 和低 pH buffer 交替洗涤的方式进行清洗

- (1) **高 pH 洗 (碱洗)**：使用后的磁珠加入 10 mL Buffer C (即 0.1 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH8.5)，漩涡振荡 60 s，磁性分离，去除上清液。
- (2) **低 pH 洗 (酸洗)**：加入 10 mL Buffer D (即 0.1 M 醋酸钠, 0.5 M NaCl, pH4.5)，漩涡振荡 60 s，磁性分离，去除上清液。
- (3) 重复碱洗、酸洗交替清洗 2 次，共 3 次。

情况 2： 重复使用次数较多时，由于沉淀、变性或非特异性吸附蛋白积累，导致磁珠结合目标蛋白的能力明显下降。去除沉淀或变性蛋白，可按下面的方法进行洗涤：

- (1) 先用 5 mL 6 M 盐酸胍洗涤 2 次，每次漩涡振荡 60 s，磁性分离，去除上清液。
- (2) 再用 10 mL 1×PBS 洗涤 3 次，每次漩涡振荡 60 s，磁性分离，去除上清液。

情况 3： 去除疏水性结合物质，可按下面的方法进行洗涤：

- (1) 先用 5 mL 70% 乙醇或浓度为 0.1% 的非离子型表面活性剂洗涤 3 次，每次漩涡振荡 60 s，磁性分离，去除上清液。
- (2) 再用 10 mL 1×PBS 洗涤 3 次，每次漩涡振荡 60 s，磁性分离，去除上清液。

注：完成情况 1 或情况 2 的清洗操作后，如果用户需要继续使用磁珠用于蛋白纯化，需先用 Buffer A 洗涤 2～3 次。如果不需要继续使用，则用 20% 乙醇洗涤磁珠 2～3 次后，再加入 20% (V/V) 乙醇到磁珠中使总体积为 10 mL，保存于 2～8°C。

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，以提高目标蛋白的回收率和纯度。

提高目标蛋白回收率的参考方法：

- (1) 延长蛋白溶液与磁珠孵育的时间。
- (2) 样品及缓冲液中加入 DTT (终浓度 1～10 mM)，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 Buffer B 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 Tween-20 (终浓度 0.1%) 或 NP-40 (终浓度 2%) 可降低非特异蛋白的吸附。
- (4) 延长洗涤时间，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。

注意事项

1. 首次使用本产品前，请务必详细阅读本说明书。
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. 请选用质量好的移液器吸头和离心管，以免磁珠贴壁或混合过程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吸或短时漩涡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. 本产品可以重复使用，重复使用时，建议纯化同种蛋白，纯化不同种类的蛋白时，建议使用新的磁珠，以防交叉污染。
8. 本产品需与磁性分离器配套使用。
9. 本产品仅供研究使用。

产品列表

货号	产品名称	规格	浓度
MCF-PBG-0002	mich® Beads GSH mich® GST 融合蛋白纯化磁珠	2 mL	10% (V/V)
MCF-PBG-0005	mich® Beads GSH mich® GST 融合蛋白纯化磁珠	5 mL	10% (V/V)
MCF-PBG-0100	mich® Beads GSH mich® GST 融合蛋白纯化磁珠	100 mL	10% (V/V)
MCF-PBG-1000	mich® Beads GSH mich® GST 融合蛋白纯化磁珠	4×250 mL	10% (V/V)