

Glutathione Magnetic Agarose Beads

产品描述

Glutathione Magnetic Agarose Beads 是一种新型功能化材料，用于高效、快速纯化 GST 融合蛋白，可通过磁性分离方式直接从生物样品中一步纯化出高纯度的目标蛋白，具有简单，高效，纯度高，省事等特点。

产品特点

配体	谷胱甘肽
载量	>10 mg GST蛋白(30 kDa) (100%磁珠)
磁珠粒径	30 μm~100 μm
储存&稳定性	2-8°C 储存24个月
储存缓冲液	20% 乙醇
体积	5ml(琼脂糖磁珠占 20%)

纯化步骤

1. 准备 buffer

结合/洗杂液: PBS, pH 7.4

洗脱液: 50 mM Tris-HCl, 10 mM 还原型谷胱甘肽, pH 8.0
所用水和 Buffer 在使用之前建议用 0.22μm 或 0.45μm 滤膜过滤。减少杂质，提高蛋白纯化效率。

注意: 结合液和洗脱液中可加入 1-10 mM DTT。

2. 样品准备

以大肠杆菌表达系统为例

1. 4°C 离心 30 分钟 (4000 g) 收集菌体，弃上清。
2. 用冷 1×PBS 重悬细胞，如果需要，可加入适量的添加剂，如非离子去污剂 (NP-40) 或蛋白酶抑制剂 (PMSF) 等。
3. 用超声波破碎法在冰上破碎菌体，直到样品破碎完全。
- 4) 4°C 离心 20 分钟 (12,000 g)，除菌过滤，并小心将上清和沉淀分离
- 5). 用 SDS-PAGE 分析 GST 融合蛋白的含量及可溶性。

3. 磁珠预处理

磁珠的使用量可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，通过预实验估算其目标蛋白产量为 2~5 mg，用户需要取 5 mL 20% 的磁珠悬液用于目标蛋白的纯化。以下即以此为例进行详细说明：

- (1) 将磁珠产品置于漩涡混匀器上充分混匀，用移液器取 5mL 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 冷 1×PBS 到上述装有磁珠的离心管中，盖紧盖子，漩涡振荡 30 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。

4. 纯化重组 GST 融合蛋白

4.1 目的蛋白与磁珠结合

- 1). 将粗蛋白样品加入到装有预处理磁珠中；
- 2) 将上述离心管置于漩涡混匀器振荡 15 s，然后置于旋转混合仪上，2~8°C 的低温环境下旋转混合 20~30 min，如果需要可延长至 1h。
- 3) 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。

4.2 磁珠洗涤

- 1) 加入 5~10 mL 冷 1×PBS 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) 重复上述步骤

4.3 蛋白洗脱

- 1). 加入 2~5 mL 洗脱液于离心管中，然后将离心管置于旋转混合仪上，室温旋转混合 10 min(如果需要可延长时间)，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) 分别吸取 20-50 μl GST 融合蛋白原液、分离液，洗涤液和洗脱液，通过 SDS-PAGE 电泳分析各样品，确认是否存在蛋白
- 3). 洗脱液可以通过 4°C 透析或者分子筛去除游离的谷胱甘肽。

5. 磁珠清洗及储存

将装有磁珠的离心管中加入 1ml 洗脱缓冲液，用移液器反复吹打 3-5 次，使磁珠重复悬浮，然后置于磁力架，磁性分离，弃上清，重复该操作 2 次。向离心管中加入 1ml 去离子水，用移液器反复吹打 3-5 次，使磁珠重复悬浮，然后置于磁力架，磁性分离，弃上清，重复该操作 2 次。最后加入 20% 乙醇中，使总体积等于初始悬浮液体积，置于 4-8°C 保存。

6. 蛋白纯化流程的优化

由于不同蛋白性质与磁珠结合性能不同，为了提高目标蛋白的回收率和纯度，可从以下方面进行优化

- (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 1~10 mM 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 Buffer B 保证目标蛋白洗脱效率
- (7) 避免剧烈的超声破碎造成 GST 标签与目标蛋白发生断裂；
- (8) 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；
- (9) 在样品溶液和缓冲液中加入 0.1% 的 Tween20 或 2% 的 NP-40 可降低非特异蛋白的吸附；
- (10) 延长洗涤时间，增加洗涤次数；
- (11) 采用梯度浓度还原型谷胱甘肽洗脱目标蛋白。