

# Biolinkedin® 链霉亲和素凝胶

## 包装清单

名称	货号	包装
链霉亲和素凝胶	L-2301	2mL
	L-2301A	10mL
	L-2301B	25mL

## 产品概述

Biolinkedin®链霉亲和素凝胶，也称 Streptavidin 凝胶或 SA 凝胶，是由高度交联的 4%琼脂糖凝胶为基质共价结合了大量的高质量的链霉亲和素（Streptavidin）。利用生物素与链霉亲和素配体之间的相互作用纯化生物素或生物素化的蛋白、抗体等物质。链霉亲和素与生物素之间的亲和力很强，需要在变性条件下洗脱，链霉亲和素对亚氨基生物素的亲和力相对较弱，可以在 pH9.5-11.0 结合，pH4.0 时洗脱，不需要使用变性剂所以能更好的保持亲和素偶联物的活性。

链霉亲和素凝胶主要用于分离纯化生物素标记的核酸、抗体、蛋白或相关复合物等，也可用于免疫沉淀（IP）、细胞分选、DNA-蛋白相互作用研究等。

## 产品特性

基质	高度交联的 4%琼脂糖凝胶（4FF）
配体	重组 Streptavidin 蛋白
浓度	凝胶体积占悬浮液体积的 50%
粒径	45~135µm
耐压流速	80~150cm/h（0.3MPa，3bar）
结合能力	≥10mg 生物素化 IgG/mL 凝胶 ≥15mg 生物素化 BSA/mL 凝胶
适用范围	①分离纯化：结合生物素化蛋白、抗体等； ②分子相互作用：IP，Co-IP，RNA Pulldown 等。
保质期	在 2~8℃稳定保存两年

## 操作流程

### （一）生物素化分子纯化操作流程

#### 1. 使用前准备

##### 1.1 缓冲液：

生物素或生物素化分子的纯化

缓冲液	配方
平衡/洗杂液	0.15M NaCl，20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ，pH 7.2
洗脱液	8M 盐酸胍，pH1.5

注：盐酸胍洗脱与 SDS 会产生沉淀，若进行 SDS-PAGE 跑胶请不要使用盐酸胍洗脱，直接使用 0.1%SDS 煮沸 5min。

## 亚氨基生物素标签分子的纯化

缓冲液	配方
平衡/洗杂液	0.5M NaCl，50mM 碳酸铵，pH 10.0
洗脱液	0.5M NaCl，50mM 碳酸铵，pH 4.0

1.2 漩涡振荡器、旋转混合仪、移液器、枪头及离心管

#### 1. 样品准备

上样之前要确保样品溶液有合适的离子强度和 pH 值，用平衡/洗杂液对血清样品、腹水或细胞培养液稀释，或者将样品置于平衡/洗杂液透析。样品在上样前建议离心并用 0.22µm 或 0.45µm 滤膜过滤，减少杂质，提高蛋白纯化效率。

#### 2. 凝胶装填

1) 取合适规格的亲和层析柱，装入垫片，加入适量去离子水润洗柱管和垫片，关闭下出口。

2) 将链霉亲和素凝胶混合均匀，用移液器吸取适量浆液加入至层析柱中（凝胶实际体积占悬液的一半），打开下出口流出保护液。

3) 加入适量去离子水冲洗凝胶，待柱中液体流出后，关闭下出口。

4) 装填好的层析柱加入平衡/洗杂液进行平衡，暂不使用时则加入保护液，2~8℃保存。

#### 3. 样品纯化

##### 3.1 孵育法纯化

1) 根据纯化的样品量，取适量链霉亲和素凝胶加入离心管中，1000rpm 离心 1min，去除上清；

2) 向离心管中加入 5 倍凝胶体积的平衡/洗杂液清洗凝胶，1000rpm 离心 1min，去除上清，重复 2 次以上。

3) 加入样品，置于旋转混匀仪，2~8℃孵育 2~4h 或者过夜孵育。

4) 孵育结束后，1000rpm 离心 1min，吸取上清至新离心管，上清保留作为流穿，用于电泳鉴定。

5) 用 5 倍凝胶体积的平衡/洗杂液清洗凝胶，1000rpm 离心 1min，去除上清（注意不要吸到凝胶），重复 3~5 次，中间建议更换新离心管。

6) 加入 3~5 倍凝胶体积的洗脱液进行洗脱，室温孵育 5~15min，1000rpm 离心 1min 收集洗脱液，可重复 2~3 次。

### 3.2 层析柱法纯化

溶液用量按柱体积计算 (例如 5 倍柱体积, 1mL 规格对应为 5mL 溶液, 10mL 规格对应为 50mL 溶液)。

- 1) 将装填好的**链霉亲和素凝胶**层析柱用 5 倍柱体积**平衡/洗杂液**进行平衡, 使凝胶处于与目的分子相同的缓冲液体系下, 重复 2~3 次。
- 2) 将样品加到平衡好的层析柱中, 置于旋转混匀仪孵育 30~60min 后, 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**平衡/洗杂液**进行洗杂, 去除非特异性吸附的杂质, 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分子被洗脱, 又可以得到高纯度和高浓度的分子。

### 3.3 SDS-PAGE 检测 (针对生物素化蛋白)

将使用纯化产品得到的样品 (包括流穿组分、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。

### 4. 凝胶清洗

**链霉亲和素凝胶**可以重复使用而无需再生, 但随着一些变性物质的沉淀和蛋白的聚集, 往往造成流速和结合载量都下降, 严重影响柱子的性能, 这时需要对凝胶进行清洗。

#### 去除一些沉淀或变性物质

用 2 倍柱体积的 0.1M NaOH 或 6M 盐酸胍或 8M 尿素进行清洗, 然后立即用 5 倍柱体积的 PBS (pH 7.4) 清洗。

#### 去除一些疏水性吸附造成的非特异性吸附物质

用 3~4 倍柱体积的 70%乙醇或 2 倍柱体积的 1% Triton X-100 清洗, 然后立即用 5 倍柱体积的 PBS (pH 7.4) 清洗。

## (二) 生物素化抗体免疫沉淀操作流程

**注意:** 缓冲液自行准备或直接购买我司 IP 试剂盒。

### 免疫复合物的制备

**注意:** 样品所需的量和孵育时间均依赖于每个特定的抗体-抗原体系, 因而可能需要优化才能得到最大产量。

以下实验方案针对 2~10 $\mu$ g 生物素化抗体, 根据需要可以按比例放大。

1. 在离心管中 将每个样品的细胞裂解液与 2~10 $\mu$ g 生物素化抗体结合。每个免疫沉淀反应推荐的总蛋白量为 500~1500 $\mu$ g。
2. 用 IP Lysis/Wash Buffer 将抗体以及制备好的样品稀释至 300~500 $\mu$ L。
3. 在室温下孵育 1~2h, 或 4 $^{\circ}$ C 2~4h, 以形成免疫复合物。

### 免疫沉淀:

**注意:** 为保证凝胶均匀分布, 使用前通过反复颠倒或轻微涡旋混匀瓶中凝胶。

1. 将 20~50 $\mu$ L 的 Biolinkedin<sup>®</sup> 链霉亲和素凝胶加入 1.5mL 离心管中。
2. 向凝胶中加入 500 $\mu$ L 预冷 PBS, 轻柔混匀。
3. 将离心管放入离心机中 1000rpm、5min 收集凝胶到离心管的底部, 去除上清。
4. 向离心管中加入 200~500 $\mu$ L IP Lysis/Wash Buffer。颠倒离心管数次或轻微涡旋混匀 1min。将离心管放入离心机中 1000rpm, 5min 收集凝胶到离心管的底部, 去除上清。
5. 将抗原样品/抗体混合物加入装有凝胶的离心管中, 保持混匀室温下孵育 1~2h, 或 4 $^{\circ}$ C 2~4h。
6. 离心 1000rpm, 5min 收集凝胶, 除去未结合的样品, 保存以备分析。
7. 向离心管中加入 1000 $\mu$ L IP Lysis/Wash Buffer, 轻柔混匀 5~10min。收集凝胶, 弃上清。再重复洗两次。
8. **变性洗脱:** 向离心管中加入 80~100 $\mu$ L SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1 $\times$ ), 将样品置于 100 $^{\circ}$ C 水浴或者金属浴中加热 10min。通过离心分离凝胶, 保留含有目的抗原的上清。

**备注:** 如需保持蛋白活性, 也可采用以下洗脱方式。

**低 pH 洗脱:** 向离心管中加入 100 $\mu$ L Elution Buffer。保持混匀在室温下孵育离心管 5~10min。通过磁力分离磁珠, 保留含有目的抗原的上清。每 100 $\mu$ L 洗出液中加入 20 $\mu$ L Neutralization Buffer 来中和低 pH。

### 注意事项

1. 进行实验操作之前, 请务必认真阅读本操作说明书。
2. 实验中 SA 与生物素化分子结合的能力是有区别的, 结合还会受到 Buffer 的影响, 因此**可自行优化操作细节或者筛选及配制缓冲液进行实验。**
3. 凝胶使用前应充分振荡均匀。凝胶应保存在储存溶液中, 防止干燥。
4. 本产品仅供科学研究使用。

### 相关产品

货号	产品名称
L-1012	链霉亲和素磁珠
L-2301	链霉亲和素凝胶
L-2302	Strep-Tactin XT ( Strep-Tag II ) 凝胶