

公司产品仅供科学研究使用、不得用于临床诊断！

商品属性：

产品名称	规格	货号
GST Magnetic Beads	1ml (20mg/ml)	P-PR1064

产品介绍： GST Magnetic Beads 是 1 μ m 大小均匀的，表面覆盖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

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 /Wshing 缓冲液方式重新悬浮。
4. 分别从上清液和沉淀液中吸取 10 μ l 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，从磁力分离器上取管，用 4 倍体积的 1x Binding /Wshing 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 1xBinding/Wshing 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 /Wshing 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 /Wshing 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，从磁珠上洗脱下结合蛋白。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 /Wshing 缓冲液，快速平衡磁珠。对于长期储存，磁珠应储存在 4°C 的 20%乙醇中。