

01/产品概述

QS01031 以偶联有Streptactin XT 蛋白的高度交联琼脂糖凝胶为基质，可用于纯化带有 Strep-tag II 和 Twin Strep-tag II 标签的重组蛋白，适配ÄKTA 等各类商品化的中低压色谱系统。Strep-tag II 是由 8 个氨基酸 (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) 构成的短序列，对重组蛋白几乎没有影响，纯化后无需切除，改进的 Twin Strep-tag II 是通过 Linker 连接的两个 Strep-tag II 序列，可以像 Strep-tag II 一样实现对目标蛋白的温和快速纯化。本产品具有良好的兼容性，适用于昆虫细胞、哺乳动物细胞、酵母、细菌等表达系统来源的样品。

02/产品组分

| 组分 | 货号 | 规格 |
|---------|--------------|--------|
| QS01031 | QS01031-0005 | 5 ml |
| | QS01031-0025 | 25 ml |
| | QS01031-0100 | 100 ml |

03/保存条件

2 ~ 8℃ 保存，根据不同目的地调整运输方式。

04/适用范围

适用于捕获和纯化带有 Strep-tag II 和 Twin Strep-tag 标签的蛋白，包括昆虫细胞、哺乳动物细胞、酵母、细菌等表达系统来源的样品。

05/自备材料

05-1 /缓冲液准备:

可使用下列推荐缓冲液，洗脱原理为生物素竞争性洗脱。缓冲液在使用前最好用 0.22 μm 或者 0.45 μm 滤膜过滤除菌，避免堵塞仪器或填料。

1. 可溶性 Strep-tag 蛋白纯化:

a. 平衡缓冲液: 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0

b. 洗脱缓冲液: 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM D-Biotin, pH 8.0

再生液: 10 - 50 mM NaOH (现配现用) 或者 3 M MgCl₂

05-2 /样品准备:

1. 原核表达的可溶性蛋白

a. 原核表达结束后，将培养液转移至离心管，离心收集菌体，按照菌体 : 平衡缓冲液 = 1 : 10 (w/v) 的比例进行破碎 (为防止蛋白降解可加入终浓度为 1 mM 的 PMSF 或其他蛋白酶抑制剂; 若菌体黏度较高，可适当加入 10 μg/ml RNase A 和 5 μg/ml DNase I 降解核酸，降低黏度)。

b. 将菌体重悬后混匀，通过超声破碎或高压破碎释放蛋白。

c. 将破碎后的菌液转移至离心管中，10,000 rpm (16,744 × g)，4℃ 离心 20 - 30 min，取上清，用 0.22 μm 或者 0.45 μm 滤膜过滤，置于冰上备用。



2. 酵母、昆虫或哺乳细胞等真核细胞分泌表达的可溶性蛋白

- a. 将细胞培养液转移至离心管中，7,000 rpm(11,720 × g)，4℃离心 15 min，取上清。 b. 用 0.22 μm 或者 0.45 μm 滤膜过滤。
- c. 样品中含有可耐受范围内试剂可不用进行透析或脱盐，可直接上样。

06/注意事项

本产品仅供科学研究使用，不得用于临床医学诊断及非合理用途。

07/实验流程 (以 1 ml 规格为例)

07-1/样品纯化 (预装柱)

1. 水洗：用 5 - 10 倍柱体积 ddH₂O 以 1 - 2 ml/min 流速清洗填料，去除乙醇。
2. 平衡：用 5 - 10 倍柱体积平衡缓冲液以 1 - 2 ml/min 流速平衡填料，保证填料中的溶液组分、pH 与样本一致。
3. 进样：低流速进行上样，建议流速为 1 ml/min(样品的上样量不要超过柱子的最大结合能力，防止过载或超压；蛋白的结合能力随着裂解物的类型、目标蛋白的性质、流速、pH 变化而变化，流速越低，结合效率越高)，收集流穿液。
4. 洗涤：用 5 - 10 倍柱体积平衡缓冲液以 1 ml/min 流速平衡填料，保证样本与填料的结合处于稳定状态。
5. 洗脱：用 5 - 10 倍柱体积洗脱缓冲液洗脱目的蛋白，并收集含有目的蛋白的洗脱液。
6. 清洗和再生：用 5 - 10 倍平衡缓冲液清洗介质后，用 5 - 10 倍柱体积的再生液进行再生(洗去与配体结合的 biotin)，接着用 5 - 10 倍柱体积 ddH₂O 冲洗，洗去再生液。
7. 保存：用 5 倍柱体积的 20%乙醇冲洗柱子，置于 2 ~ 8℃ 保存，防止填料被细菌污染。(短期内频繁使用，可水洗后直接 2 ~ 8℃ 保存)。

07-2/样品纯化 (孵育法)

1. 根据纯化的样品量，取适量的 Streptactin XT Agarose Beads 4FF (QS01031) 到离心管中，1000 rpm 离心 1 min，弃上清；或将填料加入到重力柱中，自然流干保护液。
2. 向离心管中加入 3 - 5 倍填料体积的平衡缓冲液，上下颠倒混匀，1000 rpm 离心 1 min，弃上清。或向重力柱中加入平衡缓冲液 3 - 5 倍填料体积清洗，自然流干平衡缓冲液；重复两次以上。
3. 向离心管或重力柱中加入样品，封闭后室温孵育 1 - 2h (表达量低的样品可孵育 2 - 4h)；
4. 孵育结束后，离心管 1000 rpm 离心 1 min，上清吸取保留作为流穿液，用于电泳鉴定。重力柱自然流干样品，保留作为流穿液，用于电泳鉴定。
5. 用 3 - 5 倍填料体积平衡缓冲液清洗填料，离心管 1000 rpm 离心 1 min，重力柱自然流干；重复 3 - 5 次；
6. 加入 3 - 5 倍填料体积的洗脱缓冲液洗脱，室温孵育 5 - 10 min，离心管 1000 rpm 离心 1 min 收集上清，即为洗脱液；重力柱收集洗脱液。可重复 2 - 3 次增加回收率。
7. 清洗和再生：用 5 - 10 倍平衡缓冲液清洗介质后，用 5 - 10 倍填料体积的再生液进行再生(洗去与配体结合的 biotin)，接着用 5 - 10 倍填料体积 ddH₂O 冲洗，洗去再生液。
8. 保存：填料可回收后 2 ~ 8℃ 保存于 20%乙醇中。

07-3/样品纯化 (重力柱法)

1. 根据样品量取适量的 Streptactin XT Agarose Beads 4FF (QS01031) 装填重力柱，使用 3 - 5 cv 平衡缓冲液进行平衡，重复 2 - 4 次；
2. 将样品加入到平衡好的重力柱中，调整流出速度，使样品至少在填料中保留 2 min，收集流穿液，可以反复上样提高结合效率；
3. 使用 5 - 10 cv 的平衡缓冲液进行清洗和平衡，去除非特异性吸附蛋白；
4. 使用 5 - 10 cv 的洗脱缓冲液洗脱，分段收集，分别使用 SDS-PAGE 检测，选择合适的组分进行合并。
5. 清洗和再生：用 5 - 10 倍平衡缓冲液清洗介质后，用 5 - 10 倍柱体积的再生液进行再生(洗去与配体结合的 biotin)，接着用 5 - 10 倍柱体积 ddH₂O 冲洗，洗去再生液；
6. 保存：重力柱可 2 ~ 8℃ 保存于 20%乙醇中。

07-4/SDS-PAGE 检测

地址：江苏省镇江市宝华镇仙林东路16号双创大厦1207室

www.qianzhusong.com



将纯化过程中得到的样品(包括原始样品、流出液、洗杂液及洗脱液等组分)利用 SDS-PAGE 进行检测, 判定其纯化效果。

07-5/在位清洗

在使用过程中, 如果发现反压过高或者填料表面出现明显的污染物时, 需要对其进行在位清洗操作(CIP)。CIP 可去除填料中紧密结合、沉淀或变性的物质。建议按照以下操作去除填料上残留的污染物。

| 需要去除的污染物 | 操作 |
|-----------------|---|
| 离子作用结合的蛋白、DNA | 1. 使用 5 倍柱体积的 1.5 - 5 M NaCl 溶液冲洗 10 - 15 min; 2. 使用 10 倍柱体积的 ddH ₂ O 或平衡缓冲液清洗 |
| 沉淀蛋白、疏水结合蛋白和脂蛋白 | 1. 使用 0.5 M 的 NaOH 溶液清洗 3 - 5 cv; 2. 迅速使用 10 倍柱体积的平衡缓冲液清洗至中性。 |
| 非特异性结合蛋白 | 1. 使用 6 M 尿素或 4 M 盐酸胍溶液冲洗 3 - 5cv; 2. 迅速用 10 倍柱体积的平衡缓冲液清洗至中性 |

08/实验案例

08-1/耐受 DTT 和 Urea 测试

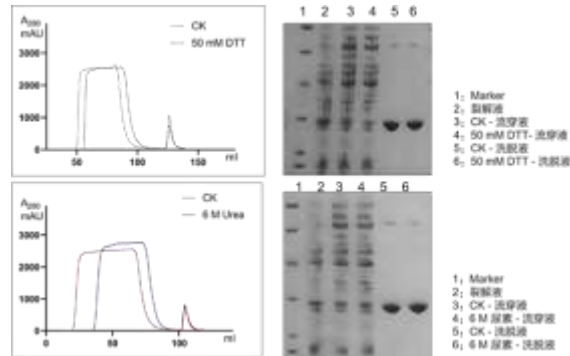
1. 纯化方案

a. 层析柱: QS01031 (1 ml)、竞品 Supplier A (1 ml) (实验组用 6 M 尿素处理)

b. 样品: 大肠杆菌表达的可溶性蛋白 (27 kDa)

c. 流速: 1 ml/ml

2. 纯化结果分析



以未用 Urea 或 DTT 处理的 QS01031 作为对照, 通过在样品中添加 50 mM DTT 或 6 M 尿素对填料进行处理, 结果显示 QS01031 可耐受高浓度还原剂 DTT, 且 6 M 尿素处理后与对照无明显区别。

(注: QS01031 允许在变性条件下进行纯化, 所有缓冲液中可添加高达 6 M 的尿素, 需要注意的是, 高浓度的尿素会导致回收率的下降。)

08-2/可重复使用性测试

1. 纯化方案

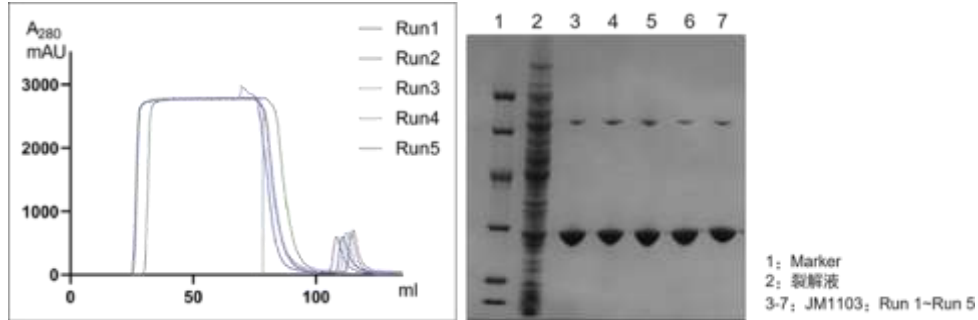
为了测试 QS01031 的可重复使用性, 在同一柱上进行了连续 5 次的运行。

a. 层析柱: QS01031 (1 ml)

b. 样品: 大肠杆菌表达的可溶性蛋白 (27kDa)

c. 流速: 1 ml/min

2. 纯化结果分析



为了测试 QS01031 的可重复使用性，在同一柱上连续进行了 5 次运行，每次洗脱后用 50 mM NaOH 进行再生。通过纯化图谱和 SDS-PAGE 胶图结果显示，纯化性能未见明显下降，表明 QS01031 具有较好的重复性。

附录一、QS01031 化学耐受性

| 试剂种类 | 浓度 |
|--------------------------------|--------|
| NaCl | 5 M |
| MgCl ₂ | 1 M |
| EDTA | 50 mM |
| β-Mercaptoethanol | 45 mM |
| Guanidine hydrochloride | 4 M |
| Urea | 6 M |
| Tween 20 | 2% |
| Sodium-N-dodecyl sulfate (SDS) | 0.09% |
| Glycerol | 25% |
| Imidazole | 250 mM |

常见问题与解决方案

| 问题 | 原因分析 | 推荐解决方案 |
|-------------|---------------|---|
| 柱子压力过高 | 层析介质堵塞 | 1. 按照在位清洗方法进行清洗； 2. 裂解液上柱前用 0.22 或 0.45 μm 的滤膜过滤。 |
| 样品纯化过程中曲线抖动 | 样品或缓冲液中有气泡 | 1. 样品或缓冲液进行超声脱气； 2. 若柱子进气，则用 5 - 10 ml/min 大流速冲洗柱子，直到气泡被排除干净后重新进样。 |
| 洗脱组分中没有目的蛋白 | 目的蛋白表达量低或未表达 | 1. 优化目的蛋白的表达条件。 |
| | 目的蛋白降解 | 1. 可在裂解液中加入适量的蛋白酶抑制剂，如 1 mM PMSF； 2. 裂解液在低温或冰上纯化。 |
| | 目的蛋白未被洗脱下来 | 1. 适当提高生物素洗脱浓度。 |
| 洗脱样品较杂 | 目的蛋白降解或被蛋白酶酶切 | 1. 可在裂解液中加入适量的蛋白酶抑制剂，如 1 mM PMSF； 2. 裂解液在低温或冰上纯化。 |
| | 杂蛋白与目的蛋白相互作用 | 1. 在样品或缓冲液中加入适量的还原剂或表面活性剂。 |
| | 样品上柱结束后平衡不充分 | 1. 增加二次平衡体积，确保杂质充分冲洗干净。 |