



STarm Beads 4FF

目录

1. 产品介绍.....	1
2. 纯化流程.....	2
3. 在位清洗.....	5
4. 问题及解决方案.....	5
5. 订购信息及相关产品.....	5

1. 产品介绍

Strep-tag 是一种在蛋白纯化系统中应用广泛的亲和标签。它包括两种类型 Strep-tag II 和 Twin Strep-tag II。Strep-tag II 是一个短肽标签，由 8 个氨基酸 (WSHPQFEK) 组成，可以作为 N 端或 C 端标签与蛋白质融合，对重组蛋白的影响很小。进一步改进的 Twin Strep-tag II 是一个顺序排列的两个 Strep-tag II 序列（通过内部氨基酸连接），该标签能够像 Strep-tag II 一样进行温和、快速的纯化。这两个标签可以自由结合 Streptavidin ST 和 **STarm** 中的任一配体。标签/配体的结合取决于所需的结合强度和应用。这两个标签和 Streptavidin ST 和 **STarm** 在 $\mu\text{g/ml}$ 范围内有较高亲和性。此外，这种结合标签和配体的灵活性允许在生理条件下纯化重组蛋白。

Strep-tag 标记技术可用于从各种表达系统中纯化功能性链球菌标记蛋白，包括杆状病毒、哺乳动物细胞、酵母和细菌。该技术可耐受不同的缓冲条件和添加剂(高盐、洗涤剂、还原剂、金属离子和螯合剂)，普遍适用于大部分蛋白质性质，而且方便于蛋白质和蛋白质质检相互作用分析。一般来说，上述两种标签都不干扰目标蛋白的折叠或生物活性，不与重金属离子反应，不具有离子交换特性，也不会引起蛋白质聚集。因此，纯化后无需去除 Strep-tag II 和 Twin Strep-tag II。

STarm Beads 4FF 的配体蛋白是 Streptavidin ST 的突变体，其偶联至高度交联的 4% 琼脂糖微球上。样品中低浓度(50 $\mu\text{mol/L}$) 的 D-生物素不会影响目的蛋白和 **STarm Beads 4FF** 的结合效果。该产品在使用后可用平衡液再生，或者使用 10 mM NaOH 进行一定程度的清洗。介质具体性能见表 1。 **STarm Beads 4FF** 具有较高的耐受性，可以多次使用，见图 2。

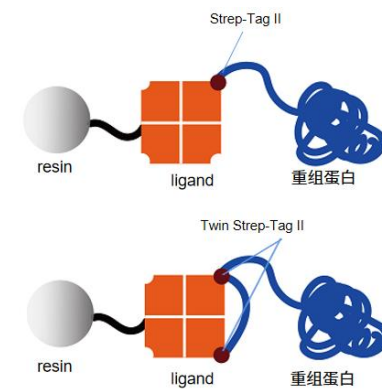


图 1. Strep-tag II 和 Twin Strep-tag II 结合示意图

表 1. STarm Beads 4FF 产品性能

项目	性能
基质	高度交联的 4% 琼脂糖凝胶
配体	STarm Mutant
载量	4 mg twin <i>Strep-tag II</i> 蛋白/ml 介质
粒径范围	45-165 μm
最大流速	300 cm/h
储存缓冲液	含 20% 乙醇的 1×PBS
储存温度	2-8°C

表 2. STarm Beads 4FF 耐受性

试剂种类	接触时间
6 M 盐酸胍	2 小时
8 M 尿素	
2 M NaCl	





表 2. STarm Beads 4FF 耐受性 (续)

试剂种类	接触时间
50 mM DTT	1 小时
50 mM β -巯基乙醇	
1 mM TCEP	
0.1% SDS	
2% 曲拉通 X-100	
2% 吐温 20	
0.25 M 咪唑	
25% 甘油	
1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
0.1 M MgCl_2	
0.1 M CaCl_2	

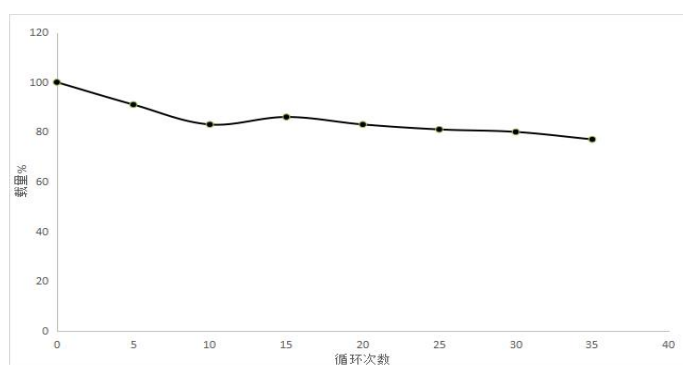


图 2. STarm Beads 4FF 的 CIP 清洗

2. 纯化流程

2.1 缓冲液的准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤。

LB 培养基: 10 g/L 蛋白胨, 5 g/L 酵母粉, 5 g/L NaCl

抗生素: 50 mg/ml Kana

诱导剂: 1 mol/L IPTG

2 X SDS-PAGE Loading Buffer: 100 mM Tris-HCl, 20%甘油, 4%SDS, 0.1% 溴酚蓝, 200 mM DTT, pH 6.8

平衡/洗杂液: 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0

或 PBS: 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , 136 mM NaCl, 2.6 mM KCl, pH7.4

洗脱液: 平衡液中加入 1-5 mM D-生物素

再生液: 10 mM NaOH

2.2 样品准备

2.2.1 目的蛋白在大肠杆菌中表达

Smart-Lifesciences 提供了 Twin Strep-tag II 的大肠杆菌表达载体, 该载体是在 pET-28a 载体的基础上改造而来预留了 BamH I 和 Xho I 的多克隆酶切位点, 方便基因片段的插入, 建议克隆方式为无缝克隆 (这种方式不会额外增加氨基酸)。克隆步骤详见 Smart Assembly Cloning Kit 说明书。

菌体培养操作步骤如下:

- 1) 挑取含有表达质粒的菌落接种于 4 ml 含有 50 $\mu\text{g/ml}$ Kana 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 8 h, 转速 200 rpm。
- 2) 取 1 ml 初始培养菌液接种到 1 L 含有 50 $\mu\text{g/ml}$ Kana 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养, 转速 200 rpm。
- 3) 检测 600 nm 处吸收值, 当 $\text{OD}_{600}=0.5-0.6$ 时, 加入 100 μl 诱导剂, 16 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 16 h, 转速 200 rpm。
- 4) 5000 rpm (3800 $\times g$), 离心 10 min, 弃去培养基, 保留沉淀。

注: 1. 细菌表达具有获得表达产物时间短、成本低的优点, 但是有些蛋白质不能在大肠杆菌中表达。在这种情况下, 酵母、昆虫、哺乳动物或植物细胞可作为替代表达宿主。





2.我们在该载体的 Twin Strep-Tag II 标签后设计了 sumo 标签促进蛋白可溶性表达, 纯化后可通过 sumo 酶将标签去除。载体 C 端还设计了 His 标签, 方便目的蛋白的进一步纯化, 提升纯度。

2.2.2 菌体裂解液的准备

- 1) 称取菌体质量, 按照菌体: 平衡液=1: 10 (W/V) 溶解。
 - 2) 冰上超声破碎细胞, 至菌液基本保持澄清。
 - 3) 取两个 10 μ l 破碎后样品, 其中一个离心分离沉淀和上清, 三个样品中分别加入 10 μ l 2 X SDS-PAGE Loading Buffer, 电泳鉴定目的蛋白可溶性。
 - 4) 如果裂解液特别粘稠, 可在每毫升菌体裂解液中加入 1-2 μ l 超级核酸酶 (Cat. No. SLP00800), 室温孵育 30 min。
 - 5) 10,000rpm(15,000 $\times$ g), 4 $^{\circ}$ C离心 20-30 min。
 - 6) 将上清转移至干净的容器中。如果重组蛋白表达成包涵体, 目的蛋白将在沉淀中。
- 注: 高浓度的游离生物素会影响介质和目的蛋白的结合, 可以通过透析、硫酸铵沉淀或者交叉流浓缩/过滤去除。

2.3 STarm Beads 4FF 装填

2.3.1 重力柱的装填

- 1) 取合适规格的重力层析柱, 装入下垫片, 加入适量纯水润洗柱管和垫片, 关闭下出口。
- 2) 将 **STarm Beads 4FF** 混合均匀, 用枪头吸取适量浆液加入至重力柱中, 打开下出口流干保护液。
- 3) 加入适量纯水冲洗介质, 待柱管中液体重力流干后, 关闭下出口。
- 4) 装入润洗后的上垫片, 确保垫片与填料之前没有空隙, 且保持水平。
- 5) 装填好的重力柱可以直接加入平衡液进行平衡。

2.3.2 中压层析柱的装填

STarm Beads 4FF 被广泛应用于工业纯化, 因此, 涉及到各种中压色谱层析柱的填装, 下面介绍使用 **STarm Beads 4FF** 填装层析柱的方法。

- 1) 用去离子水冲洗层析柱底筛板与接头, 确保柱底筛板上无气泡, 关闭柱底出口, 并在柱底部留出 1-2 cm 的去离子水。
- 2) 将介质悬浮起来, 小心的将浆液连续地倒入层析柱中。用玻璃棒沿着柱壁倒入浆液可减少气泡的产生。
- 3) 如果使用储液器, 应立即在层析柱和储液器中加满水, 将进样分配器放置于浆液表面, 连接至泵上, 避免在分配器或进样管中产生气泡。
- 4) 打开层析柱底部出口, 开启泵, 使其在设定的流速下进行。最初应让缓冲液缓慢流过层析柱, 然后缓慢增加至最终流速, 这样可避免液压对所形成柱床的冲击, 也可以避免柱床形成的不均匀。如果达不到推荐的压力或流速, 可以用你所使用泵的最大流速, 这样也可以得到一个很好的装填效果。(注意: 在随后的色谱程序中, 不要超过最大装柱流速的 75%) 当柱床高度稳定后, 在最后的装柱流速下至少再上 3 倍柱床体积的去离子水。标上柱床高度。
- 5) 关闭泵, 关闭层析柱出口。
- 6) 如果使用储液器, 去除储液器, 将分配器置于层析柱中。
- 7) 将分配器推向柱子至标记的柱床高度处。允许装柱液进入分配器, 锁紧分配器接头。
- 8) 将装填好的层析柱连接至泵或色谱系统中, 开始平衡。如果需要可以重新调整分配器。

2.4 样品纯化

STarm Beads 4FF 结合 Strep-Tag II 一般分为三步: 结合、洗杂、洗脱 (如下图 3)。

下面介绍了三种纯化方法以适应不同的实验条件。

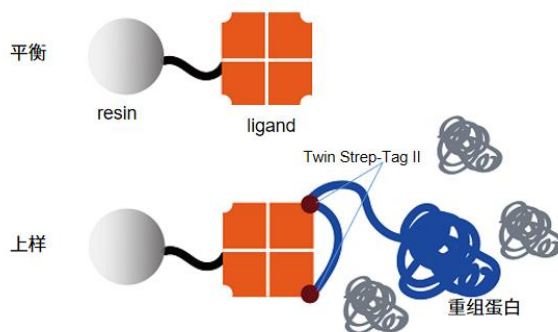


图 3.STarm Beads 4FF 纯化示意图



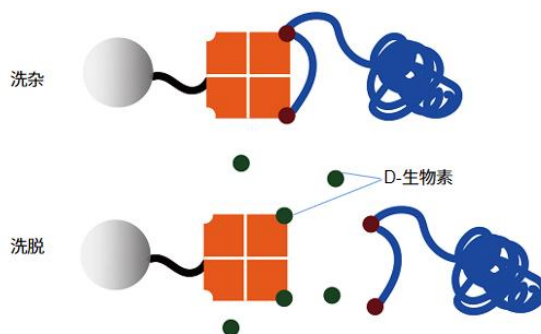


图 3.STarm Beads 4FF 纯化示意图 (续)

2.4.1 孵育法纯化

- 1) 根据纯化的样品量，取适量 **STarm Beads 4FF** 加入离心管中，1000 rpm 离心 1 min，吸弃上清；也可加入重力柱中，流干保护液。
- 2) 向离心管中加入 5 倍介质体积的平衡液清洗介质，1000 rpm 离心 1 min，吸弃上清；如使用重力柱，则直接在重力柱中清洗，直接重力流干平衡液；重复两次以上。
- 3) 加入样品，封闭离心管或重力柱管，4℃振荡孵育 2-4 h 或者 37℃孵育 30 min-2 h。
- 4) 孵育结束后，1000 rpm 离心 1 min，吸弃上清，或过滤收集介质，上清保留作为流穿，用于电泳鉴定。
- 5) 用 5 倍介质体积的洗杂液清洗介质，1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管过滤，去除上清（注意不要吸到介质），重复 3-5 次，中间建议更换新离心管。
- 6) 加入 3-5 倍柱体积的洗脱液进行洗脱，室温孵育 5 min，1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管收集洗脱液，可重复 2-3 次。

2.4.2 重力柱法纯化

- 1) 将装填好的 **STarm Beads 4FF** 重力柱用 5 倍柱体积平衡液进行平衡，使填料处于与目的蛋白相同的缓冲液体系下，重复 2-3 次。
- 2) 将样品加到平衡好的重力柱中，样品保留时间至少 2 min，保证样品和介质充分接触，收集流出液，可以反复上样增加结合效率。
- 3) 用 10-15 倍柱体积的洗杂液进行洗杂，去除非特异性吸附的杂蛋白，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蛋白被洗脱，又可以得到高纯度和高浓度的蛋白。

2.4.3 中压层析柱法纯化

STarm Beads 4FF 装填好后，可以用各种常规的中低压色谱系统。

- 1) 将泵管道中注满去离子水。去掉上塞子，将层析柱连接至色谱系统中，打开下出口，将预装柱接到色谱系统中，并旋紧。
- 2) 用 3-5 倍柱体积的去离子水冲洗出储存缓冲液。
- 3) 使用至少 5 倍柱床体积的平衡液平衡色谱柱。
- 4) 利用泵或样品环上样。注：样品的粘度增加使得即使上样体积很少，也会导致层析柱很大的反压。上样量不要超过柱子的结合能力。大量的样品体积也可能造成很大的反压，使得进样器更难使用。
- 5) 用洗杂液冲洗柱子，直到紫外吸收达到一个稳定的基线（一般至少 10-15 个柱体积）。
- 6) 使用 5-10 倍柱体积的洗脱液洗脱，收集洗脱液，即目的蛋白组分。
- 7) 洗脱结束后用平衡液冲洗色谱柱 5-10 柱体积进行再生，为避免批次间的交叉污染，可按步骤 3 进行介质的再生。

2.5 SDS-PAGE 检测

将使用纯化产品得到的样品（包括流出组分、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。

2.6 填料保存

STarm Beads 4FF 每次使用后都应进行一次再生，去除结合在介质上的 D-生物素，以确保结果的一致性，具体操作：

- 3 倍柱体积的去离子水；
- 5-10 倍柱体积的 10 mM NaOH 溶液；
- 3 倍柱体积去离子水，20%乙醇 2-8℃保存。





3. 在位清洗 (Cleaning-In-Place)

STarm Beads 4FF 多次使用后会现非特异性蛋白结合增多和蛋白聚集等现象, 往往造成流速和载量都下降, 这时可按照下面方法对介质进行清洗:

- 3 倍柱体积的去离子水;
- 5-10 倍柱体积的 0.1 M NaOH 溶液;
- 3 倍柱体积去离子水, 20%乙醇 2-8℃保存。

4. 问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
柱子反压过高	筛板被堵塞	清洗或更换筛板
	介质被堵塞	按照第3部分进行介质CIP清洗 裂解液中含有微小的固体颗粒, 建议上柱前使用滤膜 (0.22或0.45 μm) 过滤, 或者离心去除。
样品纯化过程中曲线不稳	样品或缓冲液中有气泡	去除样品或柱子中的气泡 样品和缓冲液进行脱气
	样品或缓冲液与介质温度差异较大	将样品、缓冲液和介质放置在同一温度下进行纯化
洗脱中没有目的蛋白	目的蛋白未表达或表达量较低	优化目的蛋白的表达
	蛋白降解或者被酶切	裂解液中加入适量蛋白酶抑制剂, 保护剂 在低温条件下进行纯化
	目的蛋白结合力强	提高生物素洗脱浓度
洗脱样品较杂	蛋白降解或者被酶切	裂解液中加入适量蛋白酶抑制剂, 保护剂 在低温条件下进行纯化
	杂蛋白与目的蛋白有相互作用	在缓冲液和样品裂解液中加入低浓度还原剂 在缓冲液中加入终浓度0.1% Triton X-100
	平衡/洗杂不充分	增加平衡液体积, 确保介质充分平衡/洗杂, 如介质太脏按照第3部分进行介质清洗。

5. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
STarm Beads 4FF	SA092005	5 ml
	SA092025	25 ml
	SA092100	100 ml
	SA092500	500 ml
	SA09201L	1 L
	SA09210L	10 L
PreCap STarm	SA092C11	1X1 ml
	SA092C51	5x1 ml
	SA092C15	1X5 ml
	SA092C55	5X5 ml
	SA092CS	3X1 ml+1X5 ml
Smart Assembly Cloning Kit	SC00450	50 次
	SC004250	5X50 次
D-Biotin	SLR00601	500 mg
	SLR00602	1 g
	SLR00603	5 g
pSmart-VI	SLP028	100 ng/μl, 10 μl

