

StageTips®应用手册

StageTips是一种微柱，用于多肽和蛋白质样品的方便、安全和灵敏的纯化或预分离。**StageTips**作为一次性聚丙烯枪头，适合标准加样枪和大多数商业自动化系统。微柱自身带有PTFE材料支持着密实的色谱填料颗粒。根据实际需要，可以选择常见的C18, C8和强阳离子色谱填料。**StageTips**有几种规格，包括不同的枪头形状、柱体积和化学特性。

使用:

通常，我们建议从柱的上部(即枪头的大头)加入缓冲液和样品，液体通过空气压力施压使柱中的液体流下。用随**StageTips**一起购买的2.5 mL Eppendorf Combitip可以方便的产生空气压力。与顶部加样方法相反，你也可以用**StageTips**轻微抽取真空通过枪头的尖头吸取缓冲液。但是如果采用这种方法，我们建议施加真空要保持液体流动的最小要求，因为柱填料没有固定在枪头内部，有可能会因压力过大使填料活动。

样品通过一步流程已经被有效地留在柱中，但你可以容易地通过液体在柱中的反向流动做到二步或三步流程。

注：最小的**StageTips**(C18填料)样品载量大约为3 μg蛋白质或多肽(这相当于50 picomol的BSA片断)。如果你需要纯化更高的样品量，要确信用更大的规格。

StageTips是Rappsilber, Ishihama和Mann首先发明和描述的(*Anal. Chem.* 2003, 75, 663-670). 这篇优秀论文全面论述了在蛋白质研究领域中和应用和优点，你可以在此找到更多的信息。

C8或C18 StageTips纯化方案:

1. 用10 μL 50% 甲醇/ 5% 甲酸活化柱子。
2. 用10 μL 5% 甲酸平衡柱子。
3. 从酸化水性缓冲液(类似于平衡缓冲液)中，将蛋白质或多肽加入柱中。
4. 用20 μL 5% 甲酸冲洗柱子和样品。
5. 按以下步骤洗脱样品:

- 用于纳升级电喷雾:

用1.5 μL 50% 甲醇/ 5% 甲酸洗脱。

直接洗脱至nanoES电喷针，并将洗脱液摇晃或旋转至电喷针针尖。

- 用于MALDI MS:

用1 μL基体溶液(例如: 饱和4-羟基-3-氧基-肉桂酸的70% acetonitrile / 0.1% TFA)洗脱。洗脱并直接滴加到MALDI样品台上。

- 用于LC-MS和其它用途:

用5 μL 50% 甲醇/5% 甲酸洗脱。

洗脱至微滴板或试管，留作下面步骤使用。保持样品冷却。

在使用强阳离子交换StageTips之前:

1. 用10-30 μL 50% 甲醇/5% 甲酸预活化SCX StageTips。
2. 用2 x 10-30 μL 盐溶液活化SCX StageTips(活化最好1小时)。推荐盐溶液是0.2 M磷酸钾+ 0.3 M醋酸钾。
3. 活化后用10-30 μL水冲洗。
4. 用纯化方案中使用到的最大浓度的B缓冲液2 x 10-30 μL平衡SCX StageTips(平衡最好1小时)。
5. 随后，用10-30 μL水冲洗3次。

新的SCX StageTips有时会以不希望的方式吸附少量的蛋白质。这种问题可以在样品纯化前通过用稀释廉价的多肽混合物“饱和”SCX填料来克服。我们建议，用最大浓度的B缓冲液洗脱混合物，然后在加入真正的样品前用10-30 μL水冲洗StageTips。

注：总是要用新配制的缓冲液和溶液。

SCX StageTips纯化方案:

A缓冲液: 5-25% 甲醇/ 5mM KH₂PO₄, pH 3

B缓冲液: 5-25% 甲醇/ 5mM KH₂PO₄/ 200-600 KCl, pH 3

1. 用10 μL的A缓冲液冲洗SCX StageTips
2. 在pH 2.5 - 3.5下加入样品。
3. 用10 μL的A缓冲液冲洗
4. 用10 μL的B缓冲液洗脱:

- 对于纯化洗脱，要用600 mM KCl的B缓冲液一次
- 对于分段洗脱，要用200-600 mM KCl的B缓冲液几次

对于质谱分析，我们建议用C18 StageTips除掉盐(参见上述方案)。如果可能，将样品直接洗脱至(通过) C18 StageTips。

