

Version : 02

Update : 09/30/2022

高亲和力 GST 纯化介质 (Cat.No.: L00206) GST 融合蛋白纯化试剂盒(Cat.No.: L00207)

I. 产品描述

高亲和力 GST 纯化介质 (产品编号: L00206), 适用于一步纯化 GST 融合蛋白和其他由大肠杆菌系统、昆虫细胞和哺乳动物细胞系统表达的 GST 重组蛋白。使用高亲和力 GST 纯化介质, 可以直接从预处理细胞裂解液中纯化重组 GST 融合蛋白, 它是高效纯化的最佳选择。高亲和力 GST 纯化介质的主要特点见表 1。

表 1:

基质	4 %交联琼脂糖
配体	谷胱甘肽
吸附量	35-45 mg GST 标签蛋白 (26 kDa) /ml 介质
平均粒径	90 μm (45 - 165 μm)
储存溶剂	1 \times PBS (含 20%乙醇)
储存温度	2 - 8 $^{\circ}\text{C}$; DO NOT FREEZE

金斯瑞同时提供 GST 融合蛋白纯化试剂盒 (产品编号: L00207), 它们是高亲和力 GST 纯化介质的衍生产品, 能够提供更便捷的蛋白表达和纯化实验操作。上述 2 种产品的组分见表 2。

表 2:

组分	L00206	L00207
高亲和力 GST 纯化介质	10 ml	10 ml
重力柱	N/A	5
还原性谷胱甘肽		5 x 0.154 g

II. 试剂兼容性

所列试剂的耐受浓度是通过在指示浓度下添加所列试剂来检测的。

1. 高亲和力 GST 纯化介质结合 GST 或者 GST 融合蛋白并不受 1% Triton X-100、1% Tween-20、1% CTAB、10 mM DTT、0.03% SDS 或 0.1% NP-40 的影响。这些物质可能会用于减少非特异性吸附。

III. 纯化步骤

制备细胞裂解液

1. 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 分钟 (3000 g) 收获细胞, 弃上清。
2. 用冷 1 \times PBS 重悬细胞 (每 50 ml 细胞培养基所需 3 ml 冷 1 \times PBS), 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 分钟 (3000 g) 收获细胞, 弃上清。
3. 将细胞置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻 1 小时 (如果不立刻进行试验, 也可以直接置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存)。
4. 在冰上解冻细胞, 用步骤 2 中同样量的冷 1 \times PBS 重悬细胞。如果需要, 可加入适量的添加剂, 如非

离子去污剂（NP-40）或蛋白酶抑制剂（PMSF）等。

5. 用超声波破碎法在冰上破碎细胞，直到样品不再是粘性则破碎完全。
6. 4℃离心 10 分钟（12,000 g），并小心将上清（可溶组分）转移至一支预冷的洁净试管中，用步骤 2 中同样量的冷 1×PBS 重悬沉淀（不溶组分）。
7. 分别吸取 10 μl 的可溶组分和不溶组分，用 SDS-PAGE 分析 GST 融合蛋白的含量及可溶性。

注意：

1. 如果 GST 融合蛋白是以包涵体的形式存在（不溶性蛋白），在纯化前需要完全融解和复性。

纯化重组 GST 融合蛋白

1. 轻轻摇动高亲和力 GST 纯化介质以充分重悬。
2. 吸取适量的浆液至重力柱中（L00207 中提供）。通常 1 ml 柱体积的树脂可以吸附 35-45mg GST 标签蛋白（26 kDa）。
3. 用 10 倍柱体积的冷 1×PBS（4℃）洗涤高亲和力 GST 纯化介质。
4. 将制备好的含有 GST 融合蛋白的澄清细胞裂解液加入到层析柱中，流速控制为 10-15 cm/h。
5. 裂解液全部流出层析柱后就立刻加入 1×PBS 清洗柱子，所需量大约为柱体积的 20 倍。同时也可以加入 PMSF 等蛋白酶抑制剂抑制蛋白酶的活性。
6. 用 10-15 倍柱体积的现配 10 mM 谷胱甘肽洗脱液（0.154 g 还原性谷胱甘肽溶于 50 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8.0）洗脱融合蛋白。
7. 用紫外分光光度计测定洗脱液 A280 值，计算洗脱液蛋白浓度。
8. 分别吸取 10-20 μl GST 融合蛋白原液、流出液、洗涤液和洗脱液，通过 SDS-PAGE 电泳分析各样品，确定是否存在标签蛋白。
9. 洗脱液可以通过 4℃透析或者分子筛去除游离的谷胱甘肽。

树脂再生及储存

如果纯化相同的蛋白，高亲和力 GST 纯化介质可以重复使用三次而不需要再生；

如果纯化不同的 GST 融合蛋白，则需要按下面步骤对树脂进行再生：

1. 用两倍柱体积的 0.1 M Tris HCl + 0.5 M NaCl, pH 8.5 洗涤树脂。
2. 用两倍柱体积的 0.1 M 醋酸钠 + 0.5 M NaCl, pH 4.5 洗涤树脂。
3. 用 3-5 倍柱体积的 1×PBS 洗涤树脂。
4. 若长期保存，应 2-8℃保存在 1×PBS（含 20%乙醇）中。

IV. 可能遇到的问题及解决办法

问题	可能原因	解决方法
GST 融合蛋白的产量很低或无法检测到	融合蛋白形成包涵体	采用较低的温度（20-30℃）培养细胞，或者诱导过程中降低诱导剂的终浓度至 1 mM，或者缩短诱导时间。 纯化前需要完全融解和复性。
	融合蛋白不能有效结合高亲和力 GST 纯化介质	采用批处理的方法进行纯化。将含有融合蛋白的上样液与高亲和力 GST 纯化介质在摇床上轻摇 2 个小时或者更长时间（过夜），再将混合物上柱进行后续纯化。
	融合蛋白并不包含有活性的	采用温和的超声破碎条件或

	GST	者其他的裂解条件,比如采用溶菌酶。
	融合蛋白被蛋白酶降解	在裂解步骤或洗涤步骤加入适量的蛋白酶抑制剂,如PMSF。
	融合蛋白不能有效地从树脂上洗脱下来	延长洗脱时间,或者增加洗脱液中还原性谷胱甘肽的浓度至 15 mM 或者更高。
		调节洗脱液的 pH 值至 8.0-9.0。
洗脱液中有较多杂带	融合蛋白被蛋白酶降解	在裂解步骤或洗涤步骤加入适量的蛋白酶抑制剂如PMSF。
	一些宿主蛋白,比如伴侣蛋白,可能会和融合蛋白互相作用	在洗涤液中加入 DTT(终浓度 5 mM)。 在纯化前将重组蛋白溶液和伴侣蛋白溶液(2 mM ATP, 10 mM MgSO ₄ , 50 mM Tris-HCl) 37°C 振荡 10 min。
	过度的超声处理会导致一些蛋白与融合蛋白相结合	采用温和的超声破碎条件或者其他的裂解条件。
	有些蛋白会与融合蛋白或树脂发生非特异性结合	优化洗涤条件:加入一些洗涤剂如 1% Triton X-100、1% Tween-20、0.03% SDS 或者 0.1% NP-40 可以降低非特异性吸附。优化洗涤液中的盐浓度也可以降低非特异性吸附。

V. 订购信息

高亲和力 GST 纯化介质	产品编号: L00206
GST 融合蛋白纯化试剂盒	产品编号: L00207
Glutathione MagBeads	产品编号: L00895

For research and manufacturing use. Direct human use, including taking orally and injection are forbidden.

生产商: 南京金斯瑞生物科技有限公司 江苏省南京市江宁区科学园雍熙路 28 号

Manufacturer: Nanjing GenScript Biotech Co., Ltd. No. 28 Yongxi Road, Jiangning District, Nanjing, Jiangsu, China