

Version: 04

Update: 10/15/2024

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)**

目录

I. 产品描述.....	1
II. 试剂兼容性.....	1
III. 纯化步骤.....	2
IV. 可能遇到的问题及解决办法.....	3
V. 相关产品.....	4

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: 高亲和力 GST 纯化介质的主要特点

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: 高亲和力 GST 纯化介质及其衍生产品的主要组分

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

配置缓冲溶液

用高纯度的水和化学品配置缓冲溶液。建议在使用前通过 0.45 μm 过滤器过滤缓冲液。

1. 纯化缓冲液:

平衡/洗杂缓冲液 (1 \times PBS): 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , pH 7.4

洗脱缓冲液: 用 50 mM Tris-HCl 配制的 10 mM 还原型谷胱甘肽 (pH 8.0, 现配现用)

注意: 添加谷胱甘肽会改变缓冲液的 pH 值。使用前用 NaOH 将洗脱缓冲液的最终 pH 值调整为 8.0。

2. 树脂再生缓冲液 (可选):

再生缓冲液#1: 6M 盐酸胍

再生缓冲液#2: 1% Triton X-100

再生缓冲液#3: 70%乙醇

3. 储存溶液: 1 \times PBS (含 20%乙醇)

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 $^{\circ}\text{C}$ 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 \times 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 \times PBS (4 $^{\circ}\text{C}$) 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 \times 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 $^{\circ}\text{C}$ 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。但是随着非特异性结合的蛋白增多和聚集, 往往会造成结合能力以及流速的下降, 可以参照以下方法对柱子进行清洗和再生。

去除一些沉淀或变性物质，建议使用下面的方法：

用 2 倍柱体积的 6M 盐酸胍溶液进行清洗，然后立即用 5 倍柱体积的 1×PBS 清洗

去除一些疏水性吸附造成的非特异性吸附物质：

用 3-4 倍柱体积的 70%乙醇或 2 倍柱体积的 1% Triton X-100 清洗，然后立即用 5 倍柱体积的 1×PBS 清洗：

最终将树脂保存在储存溶液（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 GST	采用温和的超声破碎条件或者其他的裂解条件，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。 在洗脱液中加入 Triton X-100（终浓度 0.1%）、辛基-葡萄糖苷（终浓度 2%）或者 NaCl（终浓度 0.1-0.2 M）。
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℃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. 相关产品

Cat. No.	Product Name
L00207	GST Fusion Protein Purification Kit
L00895	Glutathione MagBeads
L00411	GST tag ELISA Detection Kit
A00097	GST-tag Antibody, pAb, Rabbit
L00432	Anti-DYKDDDDK G1 Affinity Resin
L00907	Anti-DYKDDDDK Affinity Resin Easy
L00666	High Affinity Ni-Charged Resin FF

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