

產品名稱 & 產品編號

產品名稱: GST-tag Purification Resin

產品編號: GS018-5ml

(本品儲存在 20% 乙醇中, 凝膠體積為 5ml。使用時請把凝膠充分重懸後再吸取!)

產品介紹

GST (谷胱甘肽-S-轉移酶) 與目的蛋白融合表達後, 被稱為 GST 標籤重組蛋白。GST 標籤重組蛋白可以通過 GST 特異性地結合到 GST-tag Purification Resin, 而其它蛋白不能被結合, 含 GST 標籤的重組蛋白可被過量的還原型谷胱甘肽(GSH)溶液洗脫, 從而實現 GST 標籤蛋白的分离和純化。由於純化過程始終保持在溫和的非變性條件下, 得到的目的蛋白可以保持其自身的生物學活性, 因此可以用於常規的結構和功能研究、抗體製備、蛋白與蛋白互作、蛋白與核酸互作等方面的研究。

GST-tag Purification Resin 可用於大腸桿菌表達的 GST 標籤重組蛋白的純化, 也可用於哺乳動物細胞、昆蟲細胞及桿狀病毒等其它表達系統中表達的 GST 標籤重組蛋白。

GST 標籤重組蛋白在大腸桿菌中表達時可溶性高, 且可保持目的蛋白完整活性。許多真核蛋白在大腸桿菌中是以包涵體的形式表達的, 建議真核蛋白與 GST 融合表達, 可實現一部分蛋白的可溶性表達。

通常在目的蛋白的 N 端加 GST 標籤可保留 GST 的酶活性。

本品凝膠的顆粒直徑為 45-165 μ m。可耐受的最大壓力為 0.025MPa, 約合 5.8psi。採用固定流速進行蛋白純化時的推薦流速為 0.5ml/min。

本品對 GST 最大結合量為 5-6mg 蛋白/毫升凝膠。實際使用時的最大結合量取決於待純化的 GST 標籤重組蛋白的分子量大小和蛋白本身特性, 分子量越大則最大結合容量越大, 分子量越小則最大結合容量越小。目的蛋白分子量為 50kD 的 GST 標籤重組蛋白, 每毫升凝膠的實際最大純化量約為 8-12mg; 目的蛋白分子量為 100kD 的 GST 標籤重組蛋白, 每毫升凝膠的實際最大純化量約為 12-18mg; 相同分子量的蛋白, 若蛋白本身特性的不同, 結合的最大容量也會有所不同。

10ml 本品最多可純化 25-30mg GST 蛋白。對於目的蛋白分子量為 50kD 的 GST 標籤重組蛋白, 每毫升凝膠的實際最大純化量約為 40-60mg。

使用步驟

1. 大腸桿菌中可溶性 GST 標籤蛋白的誘導表達:(以 IPTG 誘導表達系統給予說明)
 - a. 挑取表達 GST 標籤蛋白的單克隆, 接種到 3ml 或 10-20ml 含適當抗生素的 LB 培養液中, 37 $^{\circ}$ C 過夜。
 - b. 按照 1:20 的比例取培養過夜的菌液, 接種到預熱至 37 $^{\circ}$ C 並含適當抗生素的 LB 培養液中。例如取 5ml 培養過夜的菌液接種到 100ml 預熱至 37 $^{\circ}$ C 並含適當抗生素的 LB 培養液中。具體的培養體積視需要純化的蛋白量而定, 初步的鑑定培養 3-10ml 即可; 常規的表達純化, 通常可考慮培養 100-200ml; 製備型的純化, 培養體積可以達到 1L 或更大。如果希望取得更好的表達效果, 建議按照 1:100 的比例接種過夜培養的菌液, 但後續培養至相應的 OD 值需要更長的時間。
 - c. 37 $^{\circ}$ C 常規培養約 30-60min 或更長時間, 至菌液的 OD₆₀₀ 達到 0.3-0.5。
 - d. 加入 IPTG 至終濃度為 1mM, 37 $^{\circ}$ C 誘導表達 2-4 小時。注: 可以在加入 IPTG 前取出少量菌液同樣培養 2-4 小時後作為未誘導的對照, 也可以在加入 IPTG 前直接取出少量菌液作為未誘導的對照。對於特定蛋白的誘導表達, 最佳的 IPTG 濃度、誘導溫度、和誘導時間需要通過實驗確定。
 - e. 收集菌液至離心管中, 4 $^{\circ}$ C 4,000g 離心 20 分鐘或 4 $^{\circ}$ C 15,000g 離心 1 分鐘, 棄上清, 收集沉淀。隨後即可進入細菌裂解步驟, 也可以在 -20 $^{\circ}$ C 或 -80 $^{\circ}$ C 凍存備用。冷凍保存的菌體使用前需置於冰上解凍 15 分鐘。

2. GST 标签蛋白的小量纯化

a. 离心收集 1ml 菌液的细菌沉淀并弃上清, 加入 100 μ l 裂解缓冲液, 将细菌沉淀充分重悬于裂解缓冲液中, 可进行轻微的 vortex(尽量避免产生气泡)。

注: 根据 GST 标签蛋白表达的丰度, 菌液和裂解缓冲液的体积比可以在 25:1-5:1 范围内适当调整。表达丰度非常高时, 每毫升菌液沉淀可以加入 200 μ l 裂解缓冲液; 表达丰度非常低时, 每毫升菌液沉淀可以加入 40 μ l 裂解缓冲液。如有必要, 在裂解细菌之前, 可以在裂解液中添加适量的蛋白酶抑制剂混合物,

b. 加入溶菌酶至 1mg/ml 并轻轻混匀, 尽量避免产生气泡, 冰水浴或冰上放置 30min。(也可不加溶菌酶, 直接冰上超声裂解细菌), 超声功率 200-300W, 每次超声处理 10s, 每次间隔 10s, 共超声处理 6 次。(具体超声处理的方式须根据特定型号的超声仪器自行摸索和优化)

c. 轻轻 vortex 数下, 以充分裂解细菌, 尽量避免产生气泡。

d. 4 $^{\circ}$ C 离心(15000g \times 10min), 取 10 μ l 上清留样作后续检测用, 收集剩余上清到新的离心管中。

注: 本步骤及后续步骤收集的上清必须保持澄清, 不含任何不溶物。上清中如果混有不溶性杂质会严重影响后续纯化获得蛋白的纯度。

e. 加入 20 μ l 混合均匀的 50% GST-tag Purification Resin, 4 $^{\circ}$ C 在摇床上缓慢摇动 30min, 以充分结合带 GST 标签的目的蛋白。

注: 缓慢摇动 30min 已经可以确保蛋白充分结合, 但可以根据时间安排的需要缓慢摇动更长时间甚至缓慢摇动过夜。(若要获得更高的标签蛋白得率, 可以参考步骤 3f 操作)

f. 4 $^{\circ}$ C 离心(1000g \times 10s)沉淀凝胶, 取 20 μ l 上清留样作后续检测用, 其余上清弃去。

g. 加入 100 μ l 裂解缓冲液重悬凝胶, 4 $^{\circ}$ C 离心(1000g \times 10s), 取 20 μ l 上清留样作后续检测用, 其余上清弃去。

h. 重复步骤 g, 再进行一次洗涤。

i. 加入 20 μ l 洗脱缓冲液, 轻轻重悬凝胶。4 $^{\circ}$ C 离心(1000g \times 10s), 收集上清及凝胶。上清即为纯化获得的带有 GST 标签的目的蛋白。

j. 重复步骤 i 两次。共洗脱并收集约 60 μ l 纯化的蛋白样品。

3. GST 标签蛋白的大量纯化 (适用于菌液体积 100ml 以上情况)

a. 对于新鲜的或解冻的细菌沉淀, 按照每克细菌沉淀湿重加入 2-5ml 的比例加入裂解缓冲液, 充分重悬菌体。如有必要, 可以在裂解细菌之前, 在裂解液中添加适量的蛋白酶抑制剂混合物。

b. 加入溶菌酶至终浓度为 1mg/ml 并混匀(也可不加溶菌酶), 冰水浴或冰上放置 30min。

c. 冰上超声裂解细菌。超声功率 200-300W, 每次超声处理 10s, 每次间隔 10s, 共超声处理 6 次。注: 具体超声处理的方式须根据特定型号的超声仪器自行摸索和优化。

d. (选做)如果超声处理后裂解液非常粘稠, 可以加入 RNase A 至 10 μ g/ml 及 DNase I 至 5 μ g/ml, 冰上放置 10-15min。或者可使用适当的较细针头的注射器, 反复抽吸数次, 以剪切粘稠的基因组 DNA 等。

e. 4 $^{\circ}$ C 10,000g 离心 20-30min, 收集细菌裂解液上清并置于冰水浴或冰上。可以取 20 μ l 上清留作后续检测用。注: 上清必须保持澄清, 不含任何不溶物, 才能进行下一步的纯化。否则会严重影响后续纯化获得蛋白的纯度。

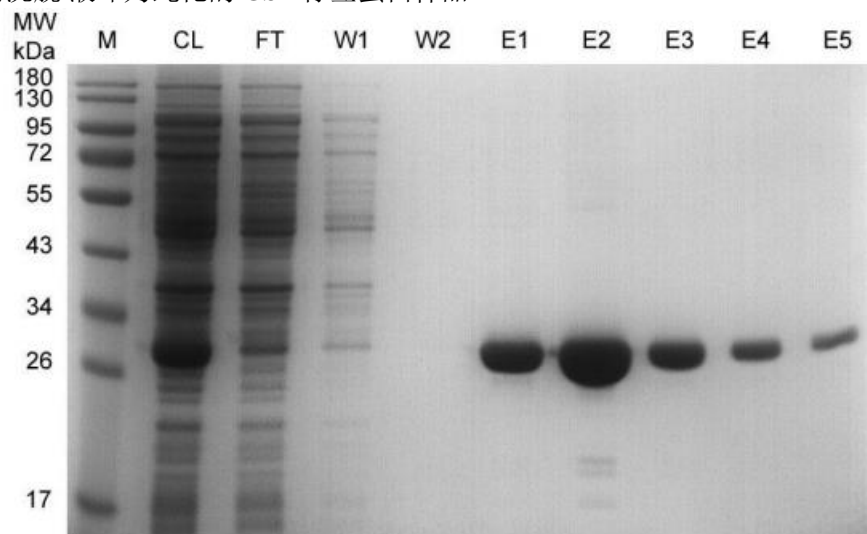
f. 取适量混合均匀的 GST-tag Purification Resin, 4 $^{\circ}$ C 离心(1000g \times 10s)弃去储存液, 向凝胶中加入等体积的裂解缓冲液以重悬并平衡凝胶, 4 $^{\circ}$ C 离心(1000g \times 10s)弃去液体, 再重复平衡 1-2 次, 弃去液体。按照每 0.5ml 凝胶(相当于 1ml 50%的凝胶)中加入 4ml 细菌裂解液上清的比例(1:8), 混合细菌裂解液上清和 GST-tag Purification Resin。4 $^{\circ}$ C 在侧摆摇床或水平摇床上缓慢摇动 60min。

g. 将裂解液和 GST-tag Purification Resin 的混合物装入适当的亲和层析柱空柱管。

注: 也可先装柱, 用 1 倍柱体积的裂解缓冲液平衡后加入细菌裂解液上清, 后续可以把流穿液收集后重复上柱 3-5 次以充分结合目的蛋白。先混合后装柱的方式操作起来相对麻烦一些, 但更有利于 GST 标签蛋白与填料的充分结合。

免費服務專線:4000-855-868 網站:www.mdbio.com.cn 電子郵件:mdbio@mdbio.com.cn

- h. 將純化柱底部的蓋子打開，在重力作用下使柱內液體流出，收集約 20 微升流穿液作後續分析用。
- i. 洗柱 5 次，每次加入 1-2 個柱體積的裂解緩衝液，每次均收集約 20 微升穿柱的液體用於後續的分析檢測。例如 1ml 混合均勻的 50% GST-tag Purification Resin 裝柱後的柱體積為 0.5ml，即 1ml 混合均勻的 50% GST-tag Purification Resin 裝柱後每次洗柱的裂解緩衝液體積為 0.5ml。洗柱及下一步洗脫過程中可以用 Bradford 法檢測每次洗滌液和洗脫液中的蛋白含量，從而考慮增加或減少洗滌和洗脫的次數。
- 注：如果出現後續獲得蛋白純度不夠高的情況，可以再增加洗柱次數 2-3 次。若有需要，也可以用 PreScission Protease, TEV Protease 或 Thrombin 等酶切融合蛋白的 GST 標簽從而釋放目的蛋白。
- j. 洗脫目的蛋白 6-10 次，每次用一個柱體積的洗脫緩衝液。將每次的洗脫液分別收集到不同的離心管中。收集獲得的洗脫液即為純化的 GST 標簽蛋白樣品。



M: marker; CL: 細菌裂解液(cell lysate); FT: 上樣流穿液(flow through); W1-W2: 洗滌液 1-2 (wash 1-2); E1-E5: 洗脫液 1-5 (elution 1-5)。注：實際的電泳結果會因樣品、上樣量等的不同而有所不同。

常見問題:

GST-tag Purification Resin 的再生:

GST-tag Purification Resin 的蛋白結合能力下降時，其原因可能是由於蛋白沉淀、變性蛋白或非特異結合蛋白積累在介質上導致，此時可通過以下方法再生。

a. 去除蛋白沉淀或變性蛋白:

用 2 倍柱體積的 6M 鹽酸胍洗柱。隨後立即用 5 倍柱體積的 PBS(pH 7.3)洗柱。

b. 去除疏水結合的蛋白:

用 3-4 倍柱體積的 70% 乙醇或 2 倍柱床體積的 1% Triton X-100 洗柱。隨後立即用 5 倍柱體積的 PBS (pH 7.3) 洗柱。再生後的凝膠，用 20% 乙醇平衡後，4°C 保存。

裂解液中目的蛋白含量過低:

a. 目的蛋白表達在包涵體中。需調整表達條件(如降低蛋白表達的溫度和使用較低濃度的 IPTG 進行蛋白的誘導)，使目的蛋白至少部分實現可溶性表達 或使用變性劑溶解包涵體後復性，然後再進行純化。

b. 培養條件不正確。

c. 誘導表達的蛋白迅速降解。設置不同的誘導表達時間，摸索細菌培養、蛋白表達和降解的時間，最終選擇適當的誘導時間。若蛋白是在細菌裂解後降解，則需加入蛋白酶抑制劑。另外，在蛋白純化的所有步驟中，須嚴格保持在 4°C 左右，以盡量減緩蛋白降解。

表达的 GST 标签蛋白不与 GST-tag Purification Resin 结合

- 超声导致融合蛋白变性。超声强度过高会导致融合蛋白变性，从而不能很好地与 GST-tag Purification Resin 结合。此时宜使用温和的超声条件，并且超声过程必须在冰浴中进行。另外也可以考虑采用非超声的裂解条件。
- 目的蛋白由于还原性不足，导致空间构象异常。在裂解前向裂解缓冲液中加入 DTT 至终浓度 1-10mM，这样能显著改善某些蛋白的空间结构，从而有效改善某些 GST 标签蛋白与 GST-tag Purification Resin 的结合。
- 检测空载体表达的 GST 与 GST-tag Purification Resin 的结合能力，以确定纯化体系能否正常工作。表达 GST 的细菌裂解后，用 GST-tag Purification Resin 纯化其中的 GST。如果空载体表达的 GST 能被 GST-tag Purification Resin 很好地纯化，说明纯化体系是可以正常工作的。融合蛋白可能改变了 GST 的构象或遮蔽了 GST，从而抑制了其于 GST-tag Purification Resin 的结合。可以尝试将蛋白结合温度降低至 4°C 并减少洗柱的次数来改善，有些蛋白同 2b 中提到的加入适量的 DTT 也有可能改善纯化效果。
- 使用平衡好的 GST-tag Purification Resin 用于 GST 标签蛋白的纯化。GST 标签蛋白与 GST-tag Purification Resin 的结合在 pH6.5 以下或 pH8.0 以上会显著下降。在将蛋白裂解液与 GST-tag Purification Resin 结合前，请用裂解缓冲液充分平衡。
- 使用未使用过的 GST-tag Purification Resin。如果 GST-tag Purification Resin 已被多次使用，其与 GST 标签蛋白的结合能力可能有所下降。在发现 GST 标签蛋白不能有效结合的情况下，有必要使用未使用过的 GST-tag Purification Resin，或将 GST tag Purification Resin 再生后再尝试使用。
- 降低蛋白样品上柱时的流速。影响 GST 标签蛋白与与纯化介质结合的一个非常重要的参数是流速，GST 标签蛋白与 GSH 的结合速度相对较慢，因此在样品上柱时保持较慢的流速对于 GST 标签蛋白的充分结合非常重要。

GST 标签蛋白不能被有效洗脱

- 使用新鲜配制的洗脱缓冲液。
- 增加洗脱时间以改善洗脱效果。对于纯化柱的洗脱可以降低洗脱时的流速。
- 增加洗脱缓冲液的用量。有时是在柱上通过酶切去除 GST 标签的情况，需要使用更大量的洗脱缓冲液进行洗脱。
- 增加洗脱缓冲液中 GSH 的浓度。
洗脱缓冲液中含有的 10mM GSH 在大多数情况下是足够进行洗脱的，但也存在洗脱不完全的特殊情况。对于这种情况，可以将洗脱缓冲液中的 GSH 浓度提高至 20-50mM。
- 提高洗脱缓冲液的 pH。较低的 pH 会影响洗脱效率。在洗脱效率较低时，可以尝试提高洗脱缓冲液的 pH 至 8-9。
- 增加洗脱缓冲液中的离子强度。离子间相互作用可能会将蛋白留在柱上，增加洗脱缓冲液中的离子强度会改善这种状况。通常可以向洗脱缓冲液中加入 0.1-0.2M NaCl。
- 向洗脱缓冲液中加入非离子型去垢剂非特异的疏水作用可能会使蛋白沉淀，并阻止目的蛋白的洗脱。在此情况下，加入适当的去垢剂可能会有所改善。向洗脱缓冲液中加入 Triton X-100 至终浓度为 0.1% 或 N-octylglucoside 至终浓度为 2%，都能够显著改善某些 GST 标签蛋白的洗脱。

纯化获得的 GST 标签蛋白经 SDS-PAGE 电泳/Western blot 检测有多条条带

- 洗涤条件错误或洗涤不充分。检查纯化过程中是否严格按照说明书的建议进行了充分的洗涤。
- 70kD 蛋白与 GST 标签蛋白共纯化
70kD 蛋白可能是大肠杆菌 dnaK 基因的表达产物，该蛋白参与大肠杆菌的蛋白折叠过程。据报道它们之间的这种结合可以通过在上柱前，将 GST 标签蛋白在含有 ATP 的缓冲液(50mM Tris-HCl, 2mM ATP, 10mM MgSO₄, pH7.4)中 37°C 孵育 10 分钟而得以消除。也可以在洗涤时用上述含有 ATP 的缓冲液洗涤去除，或者后续通过离子交换柱等方法去除 70kD 蛋白。

免費服務專線:4000-855-868 網站:www.mdbio.com.cn 電子郵件:mdbio@mdbio.com.cn

- c. 加入蛋白酶抑制剂。多条条带有可能是由于 GST 标签蛋白的部分降解产生的。向裂解液中加入适当的蛋白酶抑制剂有时会有所改善。注：在使用 Thrombin 或 factor Xa 酶切 GST 标签蛋白时，溶液中的丝氨酸蛋白酶抑制剂前必须除去，否则会严重抑制酶切效果。PreScission Protease 通常不被认为是典型的丝氨酸蛋白酶，并且对多种蛋白酶抑制剂不敏感。
- d. 使用蛋白酶缺陷型菌株。多条条带的出现可能是宿主细菌表达的蛋白酶对目的蛋白的酶切结果。如果是这种情况，需要使用蛋白酶缺陷型菌株 (如 BL21(ompT))进行表达。
- e. 降低超声强度。细胞破碎效果可以通过溶液的澄清度或显微镜下观察细菌形态来判断。超声前加入溶菌酶通常可以改善超声破碎效果。尽量注意避免超声过程中产生泡沫，因为这可能会导致 GST 标签蛋白的变性。过度超声可能会导致宿主蛋白的变性 及与 GST 标签蛋白的共纯化。
- f. 采用额外的纯化步骤。非特异条带可能是与 GST 标签蛋白与各种分子伴侣的共纯化，因为它们参与大肠杆菌中新合成蛋白的正确折叠。这些蛋白包括但不限于 DnaK(70kD)、DnaJ(37kD)、GrpE(40kD)、GroEL(57kD) 和 GroES(10kD)。这种情况下，可以考虑采用额外的其它方法进一步纯化目的蛋白。
- g. 抗 GST 的抗体中检测 GST 标签蛋白出现很多杂带时可能识别大肠杆菌的某些蛋白。所使用的抗 GST 抗体可能能够与大肠杆菌某些蛋白结合，从而导致 Western 检测时出现杂带，选择经过大抽杆菌蛋白吸附过的抗 GST 抗体，就能很好地减少甚至消除这些杂带。

GST 标签蛋白不能被完全酶切

- a. PreScission Protease, TEV Protease 或 Thrombin 等酶的用量不正确。检查酶切体系中 GST 标签蛋白的量，从而确定蛋白酶的用量。通常合适的用量为，PreScission Protease 至少 10U/mg GST 标签蛋白，TEV Protease 至少 300U/mg GST 标签蛋白，Thrombin 至少 10U/mg GST 标签蛋白，Factor Xa, 酶与 GST 标签蛋白的比率至少是 1%(w/w)。在某些情形下，酶切时使用 1mg/ml 的 GST 标签蛋白可以达到比较理想的酶切效果。向反应缓冲液中加入少量 SDS(不超过 0.5%, w/v)能够显著提高 factor Xa 对某些 GST 标签蛋白的酶切效果。
- b. 增加酶切时间和提高酶的浓度。如果 GST 标签蛋白没有被完全酶切，可以尝试延长酶切时间至 20 小时或更久。酶量也可酌情增加。
- c. 确认蛋白酶特异识别的位点存在。检查设计构建的 DNA 序列，并与测序结果相比对，确认所使用酶的特异识别位点是正确的。
- d. 确保体系中没有相应蛋白酶的抑制剂。酶切前，对于在凝胶上的酶切可以用相应的酶切缓冲液平衡，对于在溶液中的酶切可以先用酶切缓冲液充分透析或者脱盐后更换成相应的酶切缓冲液。

酶切后的目的蛋白电泳分析发现多条条带

- a. 确定额外条带是何时出现的。如果检测确认酶切前这些条带是不存在的，那么这些条带就是酶切后新产生的，这很有可能是 GST 标签蛋白在宿主细胞 中发生降解导致的。如果酶切前这些条带就存在，参考之前提到的解决办法。
- b. 目的蛋白可能含有 PreScission Protease, TEV Protease 或 Thrombin 等的识别位点。此时需要仔细分析基因序列，如果确实存在，就需要考虑重新构建质粒，更换使用不同的蛋白酶。