

产品名称 & 产品编号

产品名称: GST 标签蛋白纯化试剂盒

产品编号: GS018P-5ml

(本品储存在 20%乙醇中, 凝胶体积为 5ml。使用时请把凝胶充分重悬后再吸取!)

产品介绍

GST (谷胱甘肽-S-转移酶) 与目的蛋白融合表达后, 被称为 GST 标签重组蛋白。

GST-tag Purification Resin 可用于大肠杆菌表达的 GST 标签重组蛋白的纯化, 也可用于哺乳动物细胞、昆虫细胞及杆状病毒等其它表达系统中表达的 GST 标签重组蛋白。

GST 标签重组蛋白在大肠杆菌中表达时可溶性高, 且可保持目的蛋白完整活性。许多真核蛋白在大肠杆菌中是以包涵体的形式表达的, 建议真核蛋白与 GST 融合表达, 可实现一部分蛋白的可溶性表达。

通常在目的蛋白的 N 端加 GST 标签可保留 GST 的酶活性。

本品凝胶的颗粒直径为 45-165 μ m。可耐受的最大压力为 0.025MPa, 约合 5.8psi。采用固定流速进行蛋白纯化时的推荐流速为 0.5ml/min。

本品对 GST 最大结合量为 5-6mg 蛋白/毫升凝胶。实际使用时的最大结合量取决于待纯化的 GST 标签重组蛋白的分子量大小和蛋白本身特性, 分子量越大则最大结合容量越大, 分子量越小则最大结合容量越小。目的蛋白分子量为 50kD 的 GST 标签重组蛋白, 每毫升凝胶的实际最大纯化量约为 8-12mg; 目的蛋白分子量为 100kD 的 GST 标签重组蛋白, 每毫升凝胶的实际最大纯化量约为 12-18mg; 相同分子量的蛋白, 若蛋白本身特性的不同, 结合的最大容量也会有所不同。

包装清单

产品编码	产品名称	包装	保存条件
GS018	GST-tag Purification Resin	5 mL	4°C
GS018-1	裂解缓冲液	180 mL	RT
GS018-2	缓冲液	60 mL	RT
GS018-3	GSH	184 mg	-20°C
GS018-4	溶菌酶	60 mg	-20°C
GS018-5	亲和层析柱空柱管(3 毫升)	10 套	RT
GS018-6	说明书		

洗脱缓冲液配制:

将 184mg GSH 溶于 60mL 缓冲液混匀即为洗脱缓冲液。

配制好的洗脱缓冲液应于 4°C 保存, 两周内有效。

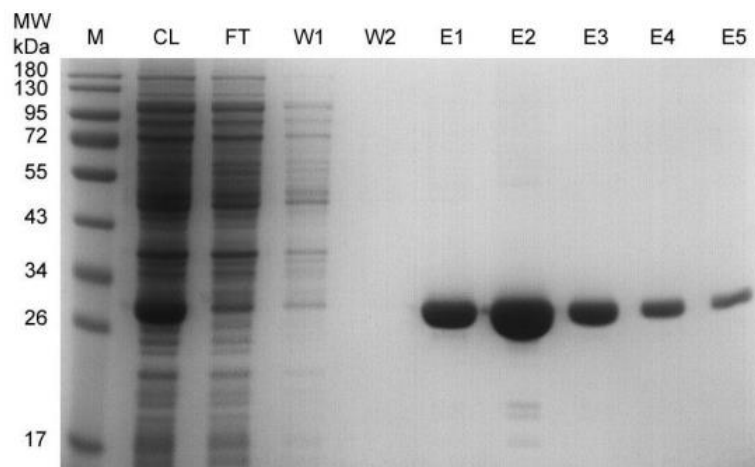
使用步骤

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

1. 大腸桿菌中可溶性 GST 標記蛋白的誘導表達:(以 IPTG 誘導表達系統給予說明)
 - a. 挑取表達 GST 標記蛋白的單克隆, 接種到 3ml 或 10-20ml 含適當抗生素的 LB 培養液中, 37°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°C 并含適當抗生素的 LB 培養液中。例如取 5ml 培養過夜的菌液接種到 100ml 預熱至 37°C 并含適當抗生素的 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°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 0.5mM-1mM, 37°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°C 4,000g 離心 20 分鐘或 4°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°C 或 -80°C 凍存備用。冷凍保存的菌體使用前需置于冰上解凍 15 分鐘。
2. GST 標記蛋白的小量純化
 - a. 離心收集 1ml 菌液的細菌沉淀并棄上清, 加入 100µl 裂解緩沖液, 將細菌沉淀充分重懸于裂解緩沖液中, 可進行輕微的 vortex(盡量避免產生氣泡)。注: 根據 GST 標記蛋白表達的豐度, 菌液和裂解緩沖液的體積比可以在 25:1-5:1 範圍內適當調整。表達豐度非常高時, 每毫升菌液沉淀可以加入 200µl 裂解緩沖液; 表達豐度非常低時, 每毫升菌液沉淀可以加入 40µl 裂解緩沖液。如有必要, 在裂解細菌之前, 可以在裂解液中添加適量的蛋白酶抑制劑混合物。
 - b. 加入溶菌酶至 1mg/ml 并輕輕混勻, 盡量避免產生氣泡, 冰水浴或冰上放置 30min。(也可不加溶菌酶, 直接冰上超聲裂解細菌), 超聲功率 200-300W, 每次超聲處理 10s, 每次間隔 10s, 共超聲處理 6 次。(具體超聲處理的方式須根據特定型號的超聲儀器自行摸索和優化)
 - c. 輕輕 vortex 數下, 以充分裂解細菌, 盡量避免產生氣泡。
 - d. 4°C 離心(15000g×10min), 取 10µl 上清留樣作後續檢測用, 收集剩餘上清到新的離心管中。注: 本步驟及後續步驟收集的上清必須保持澄清, 不含任何不溶物。上清中如果混有不溶性雜質會嚴重影響後續純化獲得蛋白的純度。
 - e. 加入 20µl 混合均勻的 50% GST-tag Purification Resin, 4°C 在搖床上緩慢搖動 30min, 以充分結合帶 GST 標記的目的蛋白。注: 緩慢搖動 30min 已經可以確保蛋白充分結合, 但可以根據時間安排的需要緩慢搖動更長時間甚至緩慢搖動過夜。(若要獲得更高的標記蛋白得率, 可以參考步驟 3f 操作)
 - f. 4°C 離心(1000g×10s)沉淀凝膠, 取 20µl 上清留樣作後續檢測用, 其餘上清棄去。
 - g. 加入 100µl 裂解緩沖液重懸凝膠, 4°C 離心(1000g×10s), 取 20µl 上清留樣作後續檢測用, 其餘上清棄去。
 - h. 重復步驟 g, 再進行一次洗滌。
 - i. 加入 20µl 洗脫緩沖液, 輕輕重懸凝膠。4°C 離心(1000g×10s), 收集上清及凝膠。上清即為純化獲得的帶有 GST 標記的目的蛋白。
 - j. 重復步驟 i 兩次。共洗脫并收集約 60µl 純化的蛋白樣品。

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

3. GST 标签蛋白的大量纯化 (适用于菌液体积 100ml 以上情况)
- 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。
 - 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。
 - 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。
 - (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。
 - 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。
 - 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。
 - 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。
 - 将纯化柱底部的盖子打开, 在重力作用下使柱内液体流出, 收集约 20 微升流穿液作后续分析用。
 - 洗柱 5 次, 每次加入 1-2 个柱体积的裂解缓冲液, 每次均收集约 20 微升穿柱的液体用于后续的分析检测用。例如 1ml 混合均匀的 50%GST-tag Purification Resin 装柱后的柱体积为 0.5ml, 即 1ml 混合均匀的 50% GST-tag Purification Resin 装柱后每次洗柱的裂解缓冲液体积为 0.5ml。洗柱及下一步洗脱过程中可以用 Bradford 法检测每次洗涤液和洗脱液中的蛋白含量, 从而考虑增加或减少洗涤和洗脱的次数。
注: 如果出现后续获得蛋白纯度不够高的情况, 可以再增加洗柱次数 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 标签从而释放目的蛋白。
 - 洗脱目的蛋白 6-10 次, 每次用一个柱体积的洗脱缓冲液。将每次的洗脱液分别收集到不同的离心管中。收集获得的洗脱液即为纯化的 GST 标签蛋白样品。



M: marker; CL: 细菌裂解液(cell lysate); FT: 上样流穿液(flow through); W1-W2: 洗涤液 1-2 (wash 1-2); E1-E5: 洗脱液 1-5 (elution 1-5)。注: 实际的电泳结果会因样品、上样量等的不同而有所不同。

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

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。

表達的 GST 標籤蛋白不與 GST-tag Purification Resin 結合

a. 超聲導致融合蛋白變性。超聲強度過高會導致融合蛋白變性, 從而不能很好地與 GST-tag Purification Resin 結合。此時宜使用溫和的超聲條件, 並且超聲過程必須在冰浴中進行。另外也可以考慮採用非超聲的裂解條件。

b. 目的蛋白由於還原性不足, 導致空間構象異常。在裂解前向裂解緩衝液中加入 DTT 至終濃度 1-10mM, 這樣能顯著改善某些蛋白的空間結構, 從而有效改善某些 GST 標籤蛋白與 GST-tag Purification Resin 的結合。c. 檢測空載體表達的 GST 與 GST-tag Purification Resin 的結合能力, 以確定純化體系能否正常工作。表達 GST 的細菌裂解後, 用 GST-tag Purification Resin 純化其中的 GST。如果空載體表達的 GST 能被 GST-tag Purification Resin 很好地純化, 說明純化體系是可以正常工作的。融合蛋白可能改變了 GST 的構象或遮蔽了 GST, 從而抑制了其與 GST-tag Purification Resin 的結合。可以嘗試將蛋白結合溫度降低至 4°C 並減少洗柱的次數來改善, 有些蛋白同 2b 中提到的加入適量的 DTT 也有可能改善純化效果。

d. 使用平衡好的 GST-tag Purification Resin 用於 GST 標籤蛋白的純化。GST 標籤蛋白與 GST-tag Purification Resin 的結合在 pH6.5 以下或 pH8.0 以上會顯著下降。在將蛋白裂解液與 GST-tag Purification Resin 結合前, 請用裂解緩衝液充分平衡。

e. 使用未使用過的 GST-tag Purification Resin。如果 GST-tag Purification Resin 已被多次使用, 其與 GST 標籤蛋白的結合能力可能有所下降。在發現 GST 標籤蛋白不能有效結合的情況下, 有必要使用未使用過的 GST-tag Purification Resin, 或將 GST tag Purification Resin 再生後再嘗試使用。

f. 降低蛋白樣品上柱時的流速。影響 GST 標籤蛋白與純化介質結合的一個非常重要的參數是流速, GST 標籤蛋白與 GSH 的結合速度相對較慢, 因此在樣品上柱時保持較慢的流速對於 GST 標籤蛋白的充分結合非常重要。

GST 標籤蛋白不能被有效洗脫

a. 使用新鮮配制的洗脫緩衝液。

b. 增加洗脫時間以改善洗脫效果。對於純化柱的洗脫可以降低洗脫時的流速。

c. 增加洗脫緩衝液的用量。有時是在柱上通過酶切去除 GST 標籤的情況, 需要使用更大量的洗脫緩衝液進行洗脫。

d. 增加洗脫緩衝液中 GSH 的濃度。

洗脫緩衝液中含有的 10mM GSH 在大多數情況下是足夠進行洗脫的, 但也存在洗脫不完全的特殊情況。對於這種情況, 可以將洗脫緩衝液中的 GSH 濃度提高至 20-50mM。

e. 提高洗脫緩衝液的 pH。較低的 pH 會影響洗脫效率。在洗脫效率較低時, 可以嘗試提高洗脫緩衝液的 pH 至 8-9。

f. 增加洗脫緩衝液中的離子強度。離子間相互作用可能會將蛋白留在柱上, 增加洗脫緩衝液中的離子強度會改善這種狀況。通常可以向洗脫緩衝液中加入 0.1-0.2M NaCl。

g. 向洗脫緩衝液中加入非離子型去垢劑 非特異的疏水作用可能會使蛋白沉淀, 並阻止目的蛋白的洗脫。在此情況下, 加入適當的去垢劑可能會有所改善。向洗脫緩衝液中加入 Triton X-100 至終濃度為 0.1% 或 N-octylglucoside 至終濃度為 2%, 都能夠顯著改善某些 GST 標籤蛋白的洗脫。

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

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

a. 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。

b. 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。

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。