

GST-Tag 蛋白纯化试剂盒(磁珠法)

产品描述

Biolinkedin®GST-Tag 蛋白纯化试剂盒是 GST 蛋白纯化琼脂糖磁珠,经过优化预制的缓冲液以及 15mL 或 50mL 的磁力架组成,用于高效、快速纯化 GST 融合蛋白,具有简单,高效,纯度高,省事等特点。

产品组成

GST 蛋白纯化琼脂糖磁珠	10mL (20% V/V)
10X 结合/洗涤液	50 mL
洗脱缓冲液 (待添加 GSH)	50 mL
还原型谷胱甘肽 GSH	184 mg/瓶
蛋白快速染色液	50 mL
SDS-PAGE Sample Loading buffer (5×)	10 mL
磁力架	50mL 双排四孔

注: 1. 使用前配制 1X 结合/洗涤液: 按照 9:1 的比例混合适量结合/洗涤液,例如 9mL 超纯水和 1mL 10X 结合/洗涤液混合,混合后的溶液即为 1X 结合/洗涤液缓冲液。

2. 10XGSH 溶液和洗脱缓冲液的配制

a. 10XGSH 溶液的配制: 将试剂盒提供的 184mg GSH 用 6mL 本试剂盒提供的洗脱缓冲液(需添加 GSH)溶解并混匀,即为 10XGSH 溶液。配制好的 10XGSH 溶液 -20°C保存,至少一年有效。

b. 洗脱缓冲液的配制: 按照 9:1 的比例混合适量洗脱缓冲液(待添加 GSH)和 10XGSH 溶液,例如 9mL 洗脱缓冲液(待添加 GSH)和 1mL 10XGSH 溶液混合,混合后的溶液即为洗脱缓冲液。由于 GSH 在溶液中容易被氧化而失效,洗脱缓冲液宜新鲜配制,配制好的洗脱缓冲液 4°C保存,两周内有效。洗脱缓冲液的组分为 50mM Tris, 10mM GSH, pH8.0。

纯化步骤

1. 样品准备

以大肠杆菌表达系统为例

1). 4°C离心 30 min (4000 g) 收集菌体,弃上清。

2). 用预冷 1×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。

3). 用超声波破碎法在冰上破碎菌体,直到样品破碎完全。

4) 4°C离心 20 min (12,000 g),除菌过滤,并小心将上清和沉淀分离,然后用 SDS-PAGE 分析 GST 融合蛋白的含量及可溶性。

2. 磁珠预处理

(1) 将**GST蛋白纯化琼脂糖磁珠**置于漩涡混匀器上充分混匀,用移液器取适量磁珠悬液于离心管中;

(2) 将离心管置于磁力架上,待溶液变澄清后,移去上清液;

(3) 加入等体积的**结合/洗涤液**到上述装有磁珠的离心管中,盖紧盖子,漩涡振荡 30s,使磁珠重新悬浮。将离心管置于磁力架上,磁性分离,移去上清液,重复洗涤 2 次。

3. 纯化重组 GST 融合蛋白

3.1 目的蛋白与磁珠结合

1). 将粗蛋白样品加入到装有预处理磁珠中;

2) 将上述离心管置于漩涡混匀器振荡 15s,然后置于旋转混合仪上,2~8°C的低温环境下旋转混合 20~30 min,如果需要可延长至 2 h 或过夜。

3) 将离心管置于磁力架上进行磁性分离,移出上清液到新的离心管中以备后续检测。从磁力架上取下离心管进行后续

4. 洗涤步骤。

4.1 磁珠洗涤

1) 加入 1-2 倍磁珠体积的**结合/洗涤液**到装有磁珠的离心管中,旋转混合 2 min,磁性分离,移出清洗液到新的离心管中,以备取样检测;

2) 重复上述步骤,3-5 次。

4.2 蛋白洗脱

1). 加入适量的**洗脱缓冲液**于离心管中,然后将离心管置于旋转混合仪上, 室温旋转混合 30 min(如果需要可延长时间), 磁性分离, 收集洗脱液到新的离心管中, 即为纯化的目标蛋白样品

2) 分别吸取 20-50 μ l GST 融合蛋白原液、分离液, 洗涤液和洗脱液, 通过 SDS-PAGE 电泳分析各样品, 确认是否存在蛋白

3). 洗脱液可以通过 4°C透析或者分子筛去除游离的谷胱甘肽。

4.3 蛋白检测

1) SDS-PAGE 检测纯化效果, 将 PAGE 胶取下放入塑料器皿中, 加入适量**蛋白快速染色液**覆盖 PAGE 胶, 然后至于摇床上摇动, 染色时间 0.5 h-2 h 或过夜均可。

2) 染色结束后, PAGE 胶放置于水中保存并拍照。

5. 磁珠清洗及储存

将装有磁珠的离心管中加入 1mL 洗脱缓冲液, 用移液器反复吹打 3-5 次, 使磁珠重复悬浮, 然后置于磁力架, 磁性分离, 弃上清, 重复该操作 2 次。向离心管中加入 1mL 去离子水, 用移液器反复吹打 3-5 次, 使磁珠重复悬浮, 然后置于磁力架, 磁性分离, 弃上清, 重复该操作 2 次。最后加入 20%乙醇中, 使总体积等于初始悬浮液体积, 置于 2-8°C 保存。

6. 可能遇到的问题及解决办法

问题	原因	解决方案
GST 融合蛋白的产量低或无法检测到	融合蛋白形成包涵体	采用低温 (16-25°C) 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。将裂解液与 GST 蛋白纯化琼脂糖磁珠在摇床上轻摇 2 个小时或者更长时间 (过夜), 充分结合后上柱纯化
	融合蛋白可能失活	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	延长洗脱时间, 或者增加洗

	地从磁珠上洗脱下来	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°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磁珠发生非特异性结合	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。