

GST 标签蛋白纯化琼脂糖凝胶

产品描述

Biolinkedin® GST 标签蛋白纯化琼脂糖凝胶是由高度交联的 4%琼脂糖凝胶为基质,用于纯化各种表达系统融合表达的 GST 标签重组蛋白。

产品信息

项目	GST 标签蛋白纯化琼脂糖凝胶
基质	高度交联的 4%琼脂糖凝胶
配体	谷胱甘肽
载量	>30 mg GST 蛋白
粒径	45-135µm
凝胶比例	50% (V/V)
储存缓冲液	20% 乙醇
保质期	在 2-8°C 稳定保存, 保质期两年

纯化步骤

1. 准备 buffer

结合/洗杂液	PBS, pH 7.4
洗脱缓冲液	50 mM Tris-HCl, 10 mM 还原型谷胱甘肽, pH 8.0

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22µm 或 0.45µm 滤膜过滤。减少杂质,提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

注: 结合液和洗脱液中可加入 1-10 mM DTT。

2. 样品准备

以大肠杆菌表达系统为例

- 1). 4°C 离心 30 分钟 (4000 g) 收集菌体, 弃上清。
- 2). 用冷 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 分钟 (12,000 g), 除菌过滤, 并小心将上清和沉淀分离。

- 5). 用 SDS-PAGE 分析 GST 融合蛋白的含量及可溶性。

3. 纯化重组 GST 标签蛋白

- 1). 轻轻重悬 GST 标签蛋白琼脂糖凝胶。
- 2). 吸取适量的 GST 标签蛋白琼脂糖凝胶至重力柱中, 用 10 倍柱体积的冷 1×PBS (4°C) 平衡 GST 标签蛋白琼脂糖凝胶。
- 3). 将制备好的含有 GST 标签蛋白澄清菌液加入到层析柱中, 流速控制为 10-15cm/h。
- 4). 裂解菌液全部流出层析柱后就立刻加入 1×PBS 清洗层析柱, 所需量大约为柱体积的 20 倍。
- 5). 用现配洗脱液洗脱融合蛋白, 所需量大约为柱体积的 10-15 倍。
- 6). 分别吸取 20-50 µL GST 标签蛋白原液、流出液、洗涤液和洗脱液, 通过 SDS-PAGE 电泳分析各样品, 确认是否存在蛋白。
- 7). 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. 树脂再生及储存

- 1). GST 标签蛋白纯化琼脂糖凝胶可以重复使用而无需再生, 但随着使用次数较多, 非特异性结合的蛋白增多和蛋白的聚集, 往往造成流速和结合载量都下降, 这时需要对树脂进行清洗。
 - a. 去除一些沉淀或变性物质
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 PBS, pH 7.4 清洗。
 - b. 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, 然后然后立即用 5 倍柱体积的 PBS, pH 7.4 清洗。然后加入 20%乙醇 2-8°C 保存。

5. 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 标签蛋白纯化琼脂糖凝胶在摇床上轻摇 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°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。