GST标签蛋白纯化试剂盒 (pH 8.0)

产品简介

GST，即谷胱甘肽-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 标签蛋白或 GST 融合蛋白。GST 标签重组蛋白可以通过 GST 特异性地结合到 GST Affinity Resin，而其它蛋白则不能被结合，含 GST 标签的重组蛋白可被过量的还原型谷胱甘肽 (GSH) 溶液洗脱，从而实现 GST 标签蛋白的分离和纯化。由于纯化过程始终保持在温和的非变性条件下，得到的目的蛋白可以保持其自身的生物学活性，因此可以用于常规的结构和功能研究、抗体制备、以及蛋白与蛋白相互作用、蛋白与核酸相互作用等方面的研究。本试剂盒不仅可以用于大肠杆菌表达的 GST 标签重组蛋白的纯化，也可以用于哺乳动物细胞、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具有可溶性高，并且容易保持目的蛋白完整活性等优点。许多真核蛋白在大肠杆菌中是以包涵体的形式表达的，但当它们在大肠杆菌中与 GST 融合表达时，相当一部分可以实现可溶性表达，从而有利于后续的纯化。如果在 GST 标签和目的蛋白之间含有位点特异性的蛋白酶识别位点，如 TEV Protease 等，则可用相应的蛋白酶切除 GST 标签。通常在目的蛋白的 N 端加上 GST 标签可以保留 GST 的酶活性，从而便于使用 GST Affinity Resin 进行 GST 标签重组蛋白的纯化。核心成分是一种 GST 标签蛋白纯化树脂，结构上以 4%交联的琼脂糖凝胶为基质，通过 12 个原子的间隔臂，用化学方法共价结合还原型谷胱甘肽制作而成。该设计使树脂的纯化效率得到了较大提高，使其每毫升基质(4%交联琼脂糖) 可承载>20 mg GST 融合蛋白。具有载量高，特异性强，特别适合大规模纯化和初筛实验。GST Affinity Resin 凝胶的颗粒直径为45-165 μm。可耐受的最大压力为0.1 MPa，约合 1 bar。GST Affinity Resin 储存在含 20%乙醇的 1×PBS 中， 10 mL 总体积中 5 mL 为琼脂糖凝胶、5 mL 为液体。使用时宜把琼脂糖凝胶充分重悬后再吸取。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，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。本试剂盒最多可纯化 10 种带有 GST 标签的重组蛋白，每种蛋白的纯化量约为 10 mg。

产品特点

1 、 快速、高效：本试剂盒使用了 GST 标签蛋白纯化树脂，挂柱效率高，缩短操作时间的同时可以有效的避免在长时间操作过程中目的蛋白的降解或变性，充分保证目的蛋白的活性。

2 、 便捷：提供了 GST 标签蛋白纯化时所需的相关试剂和亲和层析柱空柱管，为 GST 标签蛋白的纯化带来了极大的便利。

3 、 载量高：每毫升基质可承载>20 mg GST 融合蛋白。

4 、 特异性强：可以一步纯化各种表达系统中谷胱甘肽-S-转移酶、谷胱甘肽依赖性蛋白和谷胱甘肽重组衍生物。

组分表

R46229	组分	10T	储存	每次测试的数量
R46229A	GST 亲和介质	10 mL	2-8°C , Do not freeze	1 mL
R46229B	裂解缓冲液	180 mL	2-8°C	18 mL
R46229C	洗脱缓冲液	60 mL	2-8°C	6 mL
R46229D	GSH	184 mg	2-8°C	18.4 mg
R46229E	层析空柱，3 mL (盖，塞，膜)	10 EA	室温	1 EA

使用说明

一 、 样品准备

1 、 细菌或酵母表达的可溶性蛋白

(1) 挑取单菌落到含有适合抗性的培养基中，根据载体使用说明，加入相应浓度的诱导剂诱导相应的时间。

(2) 表达结束后，将培养液转移到离心瓶中，7000 rpm (7500 ×g)，离心 15 min 收集菌体，然后按照菌体与裂解液比例为 1 : 10 (W/V) 加入裂解液，根据蛋白易降解性质可选择性加入终浓度为 1 mM 的 PMSF，也可加入其他蛋白酶抑制剂，但不能影响目的蛋白与填料的结合 。根据需求可加入溶菌酶 (如果表达的宿主细胞内含 pLysS 或 pLysE，可以不加溶菌酶)。

(3) 将菌体沉淀悬浮起来 (如果菌液浓度高，也可考虑加入 10 μg/mL RNaseA 和 5 μg/mL DNaseI)，混匀，放置于冰上，然后冰水混合物上超声破碎细胞，至菌液基本保持澄清。

(4) 将澄清的破碎液转移至离心管中， 10000 rpm (15000 ×g) ，4℃离心 20-30 min。取上清，置于冰上备用，进行下一步纯化。

2 、 酵母、昆虫和哺乳细胞分泌表达可溶性蛋白

将细胞培养液转移至离心瓶，5000 rpm (3800 ×g)，离心 10 min ，收集上清，可直接上柱使用。对于大量体积的上清，需加入硫酸铵沉淀浓缩后，蛋白还需用平衡液透析后才能加入柱子。

二、 缓冲液的准备

1 、 10×GSH 溶液的配制：把试剂盒提供的 184 mg GSH 用 6 mL 本试剂盒提供的洗脱缓冲液溶解并混匀，即为 10×GSH 溶液。配制好的 10×GSH 溶液-20℃保存，至少一年有效。

2 、 1 ×GSH 洗脱缓冲液的配制：按照 9:1 的比例混合适量洗脱缓冲液和 10×GSH 溶液，例如 9 mL 洗脱缓冲液和 1 mL 10×GSH 溶液混合，混合后的溶液即为 1 ×GSH 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℃保存，两周内有效。

三、 样品纯化

样品在上样前建议离心或用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤，减少杂质，提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。缓冲液在使用前最好用 0.22 μm 或者 0.45 μm 滤膜过滤。

A. 重力柱法纯化

1 、 重力柱的装填

(1) 取层析空柱，装入下垫片，加入适量纯水润洗柱管和垫片，关闭下出口。

(2) 将 GST 亲和树脂充分混匀，用移液器吸取适量浆液加入重力柱中 (填料实际体积占悬液的一半，如吸取 1 mL 悬液，其实际体积为 0.5 mL，则最大载量约为 10 mg)，打开下出口流干保护液。

(3) 加入适量纯水冲洗填料，待柱管中液体重力流干后，关闭下出口。

(4) 加入润洗后的上垫片，确保垫片与填料之间没有空隙，且保持水平。

(5) 装填好的重力柱可以直接加入 Lysis Buffer 进行平衡，暂不使用时则加入保护液，4℃保存。

2 、 平衡

将装填好 GST 亲和树脂的重力柱用 2-5 CV (CV是指沉降后的树脂体积，以下内容提到的 CV 不再做此注解) 裂解缓冲液进行平衡，重复 2-3 次。

3 、 上样

将样品加到平衡好的重力柱中，样品缓慢流出，保证样品和填料充分接触，收集流出液，可以反复上样增加结合效率 (如果目标蛋白不稳定，建议样品置于冰上)。

4 、 洗杂

使用 5-10 CV的裂解缓冲液洗涤柱子，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液。洗柱及下一步洗脱过程中可以用 Bradford 法简单快速地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。

5 、 洗脱

使用 5-10 CV 的 1 ×GSH 洗脱缓冲液洗脱目的蛋白。分段收集，每 1-5 个 CV 收集一管，分别检测，既可以保证所有结合的目的蛋白被洗脱，又可以得到高纯度和高浓度的蛋白。

B. 孵育法纯化

1 、 树脂准备

根据纯化的样品量，取适量 GST 亲和层析介质加入离心管中， 1000 rpm 离心 1 min，小心的吸弃上清 (保持低速离心， 以免损坏树脂)；也可加入重力柱中，流干保护液。

2 、 平衡

向离心管中加入 5 CV 裂解液，轻柔上下翻动混匀， 1000 rpm 离心 1 min 后，小心的去除上清；如使用重力柱，则直接在重力柱中清洗，直接重力流干洗涤液；重复两次以上。

3 、 树脂结合目的蛋白

将准备好的样品加入到平衡好的树脂中，封闭离心管或重力柱管，旋转振荡孵育，室温30 min-2 h 或 2-8℃ 2-4 h，可适当延长时间，使混合液与树脂充分混匀 (如果目标蛋白不稳定，建议置于 2-8℃环境中结合) 。 1000 rpm 离心 1 min 后，小心的吸出上清，将上清留存进行检测分析。

4 、 洗杂

使用 5 CV 的裂解液洗涤柱子，轻柔上下翻动混匀， 1000 rpm 离心 1 min 后，小心的吸出上清，将上清留存进行检测分析。重复 3-5 次。如使用重力柱，则直接在重力柱中清洗，直接重力流干洗涤液。

5 、 洗脱

加入 3-5 CV 的 1×GSH 洗脱缓冲液进行洗脱，室温孵育 5 min ， 1000 rpm 离心 1 min或重力柱管收集洗脱液，可重复 2-3 次。

上述步骤洗脱结束后，用平衡液冲洗 3 CV，然后用纯水冲洗 5 CV，再用保护液冲洗 2 CV，然后将介质置于 2-8℃保存。

四、 样品检测与填料清洗

1 、 SDS-PAGE 检测

将纯化过程中得到的样品 (包括原始样品、流出组分、洗杂及洗脱组分等) 利用 SDS- PAGE 进行检测，判定其纯化效果。

2 、 填料清洗

在进行一定次数的使用后 (具体使用次数和上样中的污染物有关)，需要对柱子进行清洗，以下提供一种方法：

用 2 CV 6 M 盐酸胍溶液进行清洗，立即用 5 CV 的纯水清洗。再用保护液冲洗 2 CV，然后将介质置于 2-8℃保存。

去除一些疏水性吸附造成的非特异性吸附物质：用 3-4 CV 的 70%乙醇或 2 CV 的 1% Triton X-100 清洗，立即用 5 CV 的纯水清洗，再用保护液冲洗 2 CV，然后将介质置于 2- 8℃保存。

注意事项

1 、 请勿冷冻保存 GST 亲和层析介质。

2 、 GST 亲和层析介质储存在含 20%乙醇的 1×PBS 中，凝胶和保护液的体积比为 1:1。

3 、 GST 亲和层析介质使用前一定要充分颠倒若干次，使琼脂糖珠混合均匀。

4 、 本产品仅作科研用途。

5 、 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。

保质期：6个月