

GST 标签蛋白纯化试剂盒

货号: P1051-5ml

储存条件: 4°C 保存, 至少一年有效。除 Glutathione Beads 4FF 外, 其余均可以 -20°C 保存。

产品简介:

LABLEAD 的 GST 标签蛋白纯化试剂盒(GST-tag Protein Purification Kit), 俗称 GST 柱试剂盒, 是一种采用了新型的 Glutathione Beads 4FF, 并能简单、快速、高效并且高特异地纯化 GST 标签蛋白的试剂盒。试剂盒提供了 GST 标签蛋白纯化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。

本试剂盒可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 PreScission Protease, TEV Protease 或 Thrombin 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 Glutathione Beads 4FF 进行 GST 标签重组蛋白的纯化。

本试剂盒中的 Glutathione Beads 4FF 采用了一种高度交联的 6% 琼脂糖凝胶为基质, 并使用了进一步优化的接臂和 GSH 偶联技术, 可以高容量、高特异地结合 GST 标签重组蛋白。和目前市售的大多数同类产品相比, 非特异性蛋白结合更低, 耐受压力更强, GSH 的偶联更稳定。

Glutathione Beads 4FF 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。

Glutathione Beads 4FF 储存在 20% 乙醇中, 使用时宜把凝胶充分重悬后再吸取。

产品组分

编号	组分	规格
G10510	Glutathione Beads 4FF	5ml
P1051A	裂解缓冲液	100ml
P1051B	漂洗缓冲液	100ml
P1051C	洗脱缓冲液	50ml
P1051D	溶菌酶	100mg
AC003	亲和层析柱空柱管(3 毫升)	10 套/包

注意事项

- 请勿在 -20°C 或更低温度冷冻保存 Glutathione Beads 4FF。
- Glutathione Beads 4FF 保存和纯化过程中应始终保持凝胶湿润。
- 若离心不能完全除去蛋白样品中的不溶物, 可以将样品溶液用 0.45 μ m 的滤膜过滤。
- GST 标签蛋白的纯化应始终保持在非变性条件下, 如果融合蛋白以包涵体形式表达, 在使用 8M 尿素或 6M 盐酸胍溶解包涵体后, 需要通过透析去除尿素和盐酸胍并使蛋白复性后才能使用本产品进行纯化。
- 蛋白样品收集后宜尽快完成纯化工作, 并应始终放置在 4°C 或冰浴, 以减缓蛋白降解。为有效抑制蛋白降解, 可以在裂解液中添加适量的蛋白酶抑制剂混合物。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

如下以最常见的大肠杆菌中表达纯化 GST 标签蛋白为例, 说明本产品的使用方法。在其它体系中表达时, 请参考该表达体系的相关使用说明, 并借鉴大肠杆菌中纯化 GST 标签蛋白的使用说明。

1. 大肠杆菌中可溶性 GST 标签蛋白的诱导表达

如下以最常用的 IPTG 诱导表达系统给予说明, 诱导表达条件的优化请参照所使用的诱导表达体系的详细说明。其它诱导表达系统请参考适当的使用说明进行。

- 挑取表达 GST 标签蛋白的单克隆, 接种到 3ml 或 10-20ml 含适当抗生素的 LB 培养液中, 37°C 培养过夜。



b. 按照 1:20 的比例取培养过夜的菌液，接种到预热至 37°C 并含适当抗生素的 LB 培养液中。例如取 5ml 培养过夜的菌液接种到 100ml 预热至 37°C 并含适当抗生素的 LB 培养液中。具体的培养体积视需要纯化的蛋白量而定，初步的鉴定培养 3-10ml 即可；常规的表达纯化，通常可考虑培养 100-200ml；制备型的纯化，培养体积可以达到 1L 或更大。如果希望取得更好的表达效果，建议按照 1:100 的比例接种过夜培养的菌液，但后续培养至相应的 OD 值需要更长的时间。

c. 37°C 常规培养约 30-60min 或更长时间，至菌液的 OD600 达到 0.6-1.0。

d. 加入 IPTG 至终浓度为 1mM, 37°C 诱导表达 2-4 小时。

注：可以在加入 IPTG 前取出少量菌液同样培养 2-4 小时后作为未诱导的对照，也可以在加入 IPTG 前直接取出少量菌液作为未诱导的对照。对于特定蛋白的诱导表达，最佳的 IPTG 浓度、诱导温度、和诱导时间需要通过实验确定。

e. 收集菌液至离心管中，4°C 4,000g 离心 20 分钟或 4°C 15,000g 离心 1 分钟，弃上清，收集沉淀。随后即可进入细菌裂解步骤，也可以在 -20°C 或 -80°C 冻存储用。冷冻保存的菌体使用前需置于冰上解冻 15 分钟。

2. GST 标签蛋白的小量纯化

本方法常用于小量样品的快速分析和鉴定，为后续大量制备打下基础。

a. 接步骤 1(e)，离心收集 1ml 菌液的细菌沉淀并弃上清，加入 100μl 裂解缓冲液，将细菌沉淀充分重悬于裂解缓冲液中，可进行轻微的涡旋振荡(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 200μl 裂解缓冲液；表达丰度非常低时，每毫升菌液沉淀可以加入 40μl 裂解缓冲液。相关溶液的配制方法附后。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。

注：溶菌酶可以用裂解液配制成 100mg/ml 的母液，临使用前加入。溶菌酶配制成母液后，可以适当分装后 -20°C 保存。

c. 轻轻 vortex 数下，以充分裂解细菌，尽量避免产生气泡。

d. 4°C 离心(15000g×10min)，取 10μl 上清留样作后续检

测用，收集余上清至一新的洁净离心管中。

注：本步骤及后续步骤收集的上清必须保持澄清，即不含任何不溶物。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 20μl 混合均匀的 Glutathione Beads 4FF, 4°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。经测试，直接使用 Glutathione Beads 4FF 也能获得良好的纯化效果。但如果希望获得更高的标签蛋白得率，可以参考步骤 4，用与凝胶等体积的裂解缓冲液平衡 Glutathione Beads 4FF 2-3 次。平衡后，待纯化蛋白的得率通常会有所提高。

f. 4°C 离心(1000g×10s)沉淀凝胶，取 20μl 上清留样作后续检测用，其余上清弃去。

g. 加入 100μl 漂洗缓冲液重悬凝胶，4°C 离心(1000g×10s)，取 20μl 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。

注：如有需要，可根据具体情况使用酶切融合蛋白的 GST 标签从而释放目的蛋白。详细的 GST 标签酶切操作请参考步骤 5，GST 标签的酶切去除。

i. 加入 20μl 洗脱缓冲液，轻轻重悬凝胶。4°C 离心(1000g×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 60μl 纯化的蛋白样品。

3. GST 标签蛋白的大量纯化

本方法适用于较大量(例如菌液体积在 50ml 及以上)蛋白样品的纯化。

a. 接步骤 1(e)，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 4ml(2-5ml 均可)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，冰水浴或冰上放置 30min。

注：溶菌酶可以用裂解液配制成 100mg/ml 的母液，临用时前加入。溶菌酶配制成母液后，可以适当分装后 -20°C 保存。



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. (可选做)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。或者也可以使用适当的装好了较细针头的注射器，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，即不含任何不溶物，才能进行下一步的纯化。

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。

f. 取 1ml 混合均匀的 Glutathione Beads 4FF，4 $^{\circ}$ C 离心 (1000g \times 10s) 弃去储存液，向凝胶中加入 0.5ml 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。将约 4ml 细菌裂解液上清加入其中，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 Glutathione Beads 4FF 的混合物装入本试剂盒提供的亲和层析柱空柱管 (3ml) 中。

注：也可先取 1ml 混合均匀的 50% Glutathione Beads 4FF 装柱，然后用 0.5ml 裂解缓冲液平衡 2-3 次后加入约 4ml 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。

h. 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。

i. 洗柱 5 次，每次加入 0.5-1ml 漂洗缓冲液，每次均收集约 20 微升穿柱的液体用于后续的分析检测用。洗柱及下一步洗脱过程中可以用 Bradford 法 (B5105/6) 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。

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，也可以用酶切融合蛋白的 GST 标签从而释放目的蛋白。详细的 GST 标签酶切去除的方法请参考步骤 5，GST 标签的酶切去除。

j. 洗脱目的蛋白 6-10 次，每次用 0.5ml 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。

4. GST 标签的酶切去除

大多数情况下，融合表达的 GST 标签不会影响目的蛋白的活性，可以用完整的融合蛋白进行活性检测。如果 GST 标签可能影响目的蛋白的活性，那么在构建质粒时可以在 GST 标签和目的蛋白之间加入适当的蛋白酶的识别位点，例如 PreScission Protease、TEV Protease 或 Thrombin 等的识别位点，这样就可以在柱上 (on column) 或洗脱后用相应的蛋白酶切除 GST 标签。

由于 PreScission Protease 能在 4 $^{\circ}$ C 进行高效的酶切，而 TEV Protease 或 Thrombin 的最佳酶切温度是室温而且耗时较长，因此推荐在设计目的蛋白的 GST 标签时，添加 PreScission Protease 识别的酶切位点。使用 PreScission Protease 进行 GST 标签的切除进行详细的说明如下：

a. 柱上酶切含 GST 标签的融合蛋白 (以 8mg GST 标签蛋白/ml 凝胶为例)

(a) 在 GST 标签蛋白结合于纯化柱 (0.5ml) 并用洗涤液充分洗涤后，再用 5ml PreScission Protease 的酶切缓冲液平衡柱子。PreScission Protease 的酶切缓冲液的组分为 50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, pH7.5。

(b) 准备 PreScission Protease: 约每毫克 GST 标签蛋白使用 20U PreScission Protease。对于 4mg GST 标签蛋白需使用 80U PreScission Protease，用 PreScission 酶切缓冲液稀释至与凝胶柱相同的体积，即 0.5ml。

(c) 将稀释好的 0.5ml PreScission Protease 加入纯化柱中，4 $^{\circ}$ C 保持 4h (为确保酶切完全，可以 4 $^{\circ}$ C 酶切过夜)。如果蛋白结合是在离心管中进行的，可将准备好的 PreScission Protease 直接加入离心管中，4 $^{\circ}$ C 在摇床上缓慢摇动 4 小时 (为确保酶切完全，可以 4 $^{\circ}$ C 酶切过夜)。

(d) 用 0.5ml PreScission Protease 酶切缓冲液洗涤，重复三次，分别收集每次的洗涤液。如果酶切反应是在离心管中进行的，1000g 离心 2 分钟，收集上清，然后加入 0.5ml 酶切缓冲液重新沉淀，离心 (1000g \times 2min) 收集上清，接着再加入 0.5ml 酶切缓冲液重新沉淀，离心 (1000g \times 2min) 收集上清。洗脱组分中含有切除了 GST 标签的目的蛋白，而 GST 标签和带有 GST 标签的 PreScission Protease 则仍然结合在凝胶柱上。





b. 洗脱后酶切含 GST 标签的融合蛋白(以 8mg GST 标签蛋白/ml 凝胶为例)

(a) 使用脱盐柱快速除去洗脱组分中的 GSH, 或用 PreScission Protease 酶切缓冲液进行透析。

(b) 按每 100 μ g GST 标签蛋白加入 2U PreScission Protease 的比例加入蛋白酶, 如果蛋白未定量, 可以按照每 0.5ml 凝胶加入 80U PreScission Protease (按照每毫升凝胶结合 8mg GST 标签蛋白进行预估)的比例进行。4 $^{\circ}$ C 孵育 4h。

(c) 将酶切后的蛋白样品加入预先用 PreScission Protease 酶切缓冲液平衡好的 Glutathione Beads 4FF, 室温结合 20-30 分钟。

(d) 500g 离心 5 分钟, 收集上清, 其中含有切除了 GST 标签的目的蛋白, 没有消化的 GST 标签蛋白和 PreScission Protease 则结合在凝胶沉淀中。

