

谷胱甘肽琼脂糖凝胶 4B

储存条件: 2-8°C, 密封

产品规格: 10 mL/25 mL/100 mL

英文名称: GST Sepharose 4B

产品参数:

基质: 4%琼脂糖凝胶

配基: 谷胱甘肽

颗粒大小: 45-165 μm

最大流速: 75 cm/h

工作 pH: 3-12

每毫升蛋白结合量: 8 mg

产品说明:

Pgex 载体表达的外源蛋白与谷胱甘肽 S-转移酶融合, 因此可以通过谷胱甘肽-琼脂糖亲和层析进行纯化。Pgex 是一类以谷胱甘肽 (γ -谷胱甘肽半胱胺酰甘氨酸) 作为底物, 通过形成硫醇尿酸失活毒性小分子的酶。由于 GST 对底物的亲和力是亚豪摩尔级的, 谷胱甘肽琼脂糖对 GST 融合蛋白的结合能力很强, 因此谷胱甘肽固化琼脂糖形成的亲和层析凝胶 GST 及其融合蛋白的纯化效率很高, 每毫升柱床体积的凝胶能结合 8 mg 融合蛋白。可以用含游离谷胱甘肽的缓冲液洗脱结合 GST 融合蛋白, 凝胶用 3 mol/L NaCl 的缓冲液再生。

使用说明:

(一) 凝胶处理

1. 轻轻颠倒盛有谷胱甘肽-琼脂糖凝胶的容器, 将凝胶混成匀浆。
2. 取部分匀浆放入 15 mL 离心管 (每 100 mL 细菌培养物需要 2 mL 匀浆)。
3. 4°C 500 g 离心 5 分钟, 小心去掉上清。
4. 在凝胶中加入 10 倍柱床体积的冷的 PBS, 颠倒数次, 混合均匀, 4°C 500 g 离心 5 分钟, 小心去掉上清。
5. 每毫升凝胶加入 1 mL 冷的 PBS, 制成 50% 匀浆, 颠倒数次, 混合均匀, 悬液放置于冰上待用。

(二) 细胞抽提

1. 用 4 mL PBS 悬浮 100 毫升培养基的细胞沉淀。
2. 加入溶菌酶至终浓度 1 mg/mL, 冰上放置 30 分钟。

3. 用针筒将 10 mL 的 0.2% TritonX-100 注入细胞裂解物中，剧烈振动数次均匀。
4. 加入 DNase 和 RNase 至终浓度 5 µg/mL，4°C 振动孵育 10 分钟。
5. 4°C 3000 g 离心 30 分钟，去除不溶性细胞碎片，上清转移到一只新管中，加入 DTT 至终浓度 1 mmol/L。

(三) 纯化融合蛋白

1. 细胞裂解物与适量 50% 谷胱甘肽-琼脂糖凝胶匀浆混合，每 100 毫升细菌培养物加 2 mL 凝胶，于室温轻摇 30 min。
2. 混合物于 4°C 以 500 g 离心 5 分钟，小心去掉上清并留样少许进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。
3. 沉淀中加入 10 倍柱床体积的冷的 PBS，颠倒离心管数次混匀，洗去未与凝胶结合的蛋白。
4. 4°C 以 500 g 离心 5 分钟，小心去掉上清并留样少许进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。
5. 重复步骤 3 和 4 两次，保留结合 GST 融合蛋白的沉淀。

(四) 洗脱或酶解

谷胱甘肽洗脱：

1. 配制谷胱甘肽洗脱缓冲液，10 mmol/L 还原型谷胱甘肽，50 mmol/L Tris-Cl，pH8.0。
2. 沉淀中加入 1 倍柱床体积的谷胱甘肽洗脱缓冲液，室温轻轻搅动 10 min，洗脱凝胶上结合的蛋白。
3. 4°C 以 500 g 离心 5 分钟，上清（含洗脱的融合蛋白）移至管中。
4. 重复步骤 2 和 3 二次，合并三次上清。

蛋白酶解：

1. 在结合了融合蛋白的凝胶中加入凝血酶、肠激酶或 Xa 因子（根据融合蛋白中的位点选择），每毫升凝胶加入 50 单位蛋白酶（溶于 1 mL PBS）。颠倒离心管数次混匀，室温下振荡 2-16 小时，用小规模预试验确定精确时间。
2. 4°C 以 500 g 离心 5 分钟，上清小心移至新管中。（GST 仍结合在凝胶上，而靶蛋白在上清中，蛋白酶也在上清中，仍需要分离）。
3. 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析每一步样品的蛋白质组成。