

GST 标签蛋白纯化试剂盒说明书

产品编号: PTE008/PTE009-2T

保存温度: 试本品包含 AB 包装。A 包: 2-8°C/RT (常温运输); B 包: -20°C。

产品内容:

Components		PTE008/PTE009-2T	保存
A 包	谷胱甘肽-琼脂糖介质 (50%) (切勿冷冻!)	5 mL	2-8°C
	PBS 缓冲液干粉 (PM5090)	2 L	RT
	层析柱 (12 mL)	2 个	RT
B 包	超声裂解缓冲液 (仅 I 型提供)	5 mL	-20°C
	酶解液 (仅 II 型提供)	5 mL	-20°C
	PMSF (10 mg/mL)	1 mL	-20°C
	GST 洗脱液	2 mL	-20°C
说明书		1 份	

注意: I 型超声裂解法 (PTE008) 与 II 型酶解法 (PTE009) 均适用于可溶性 GST 标签蛋白的纯化。

产品说明:

重组蛋白 N 端的 GST 谷胱甘肽 S 转移酶 (Glutathione S Transferase) 能提高重组蛋白的水溶性, 所以常用于蛋白质重组表达。GST-谷胱甘肽亲和层析是利用 GST 标记的蛋白能与谷胱甘肽层析介质结合, 并能被还原型谷胱甘肽洗脱的特点而建立, 是目前分离纯化 GST 标记蛋白的重要方法。

本试剂盒可用于 2 次 GST 蛋白纯化 (50 mL 体积的细菌), 提供 5 mL 浓度为 50% 的谷胱甘肽-Agarose 介质, 可吸附 5-20 mg 的 GST 标记蛋白质。本试剂盒只能在非变性条件下使用, 只可用于纯化没形成包涵体的 GST 标记蛋白。

操作步骤:

一、重组蛋白的表达和细菌收集

1. 37°C 振荡培养 50 mL 含表达质粒的细菌到 OD₆₀₀=0.6-0.8。
2. 加 IPTG 到终浓度为 0.1 mM, 30°C 振荡培养 3 h 或 22°C 振荡培养 8 h (或过夜)。

3. 4°C, 5000 g 离心 10 min 收集 50 mL 表达菌液, 弃上清。

4. 用 30 mL 的 1×PBS 缓冲液重悬细菌沉淀, 4°C, 5000 g 离心 10 min, 弃上清。沉淀可直接用于裂解或放 -80°C 保存。

二、谷胱甘肽层析柱的准备

1. 将谷胱甘肽-琼脂糖介质充分混匀后, 取 2.5 mL 加入到预放了一片筛板的层析柱中。

2. 用 7.5 mL 预冷的 1×PBS 缓冲液洗柱, 共三次。

三、裂解

1) 超声破碎细菌: 在 50 mL 的细菌沉淀中加入 2.5 mL 冰浴的超声裂解缓冲液, 再加入 125 μL PMSF (10 mg/mL) 溶液, 冰上超声裂解菌体直到在显微镜下看见绝大多数细胞破裂。超声参数需根据仪器型号自行摸索, 但裂解物必须不粘稠, 否则会堵塞层析柱。

2) 酶法裂解细菌: 加入 2.5 mL 冰浴的酶解液, 再加入 25 μL PMSF (10 mg/mL) 溶液, 冰上放置 30 分钟。

四、纯化

1. 将超声或酶法得到的细胞裂解物在 13,000 g, 4°C 离心 10 min, 去除未裂解细胞和裂解细胞碎片以防堵柱, 所得上清即含可溶性 GST 标记蛋白。预留少量 (如 100 μL) 作为裂解液留样, 其余用于纯化。

2. 将上清液加入谷胱甘肽层析柱中, 层析柱预先用盖子将底端的漏液口堵上。让细菌裂解液和介质在 4°C 结合 1-12 h 后放开底端的盖子让重力使上柱液自然流出, 收集并保存穿透液用于 SDS-PAGE 电泳。

注意: 可将穿透液重新加入此层析柱中, 以提高结合率。

3. 用 10 mL 1×PBS 缓冲液洗柱, 收集并保存穿透液 (含杂蛋白) 并预留 100 μL 作为穿透液留样, 其余在确认实验成功后再丢弃。

4. 用 0.2-0.5 mL 的 GST 洗脱液洗柱, 收集并保存穿透液, 此穿透液即纯化的 GST 标记蛋白样品。由于它可能含蛋白酶污染, 所以纯化样品不能在 4°C 长期保存, 需留 100 μL 左右用于后续浓度测定或/和 SDS-PAGE 电泳, 其余放 -80°C 保存。

5. 用裂解液留样 (四-1)、穿透液留样 (四-3) 和纯化样品留样 (四-4) 进行蛋白定量或/和 SDS-PAGE 分析。

注意: 本操作没有预先脱盐, 故只能用 Bradford 法或 OD 检测法测定裂解液留样、穿透液留样和样品留样的蛋白浓度。按 OD 检测法, 1 OD (280 nm) 约等于 0.5 mg/mL 蛋白。由于 GST 的分子量为 26 KD, 所以在 SDS-PAGE 胶上, GST 标记蛋白将比天然蛋白大 26 KD。

五、再生 (自备试剂)

1. 用 3 倍介质体积的 6 M 盐酸胍处理柱子 10 分钟。介质为 2 mL 则用 6 mL, 下同。

2. 用 3 倍介质体积的超纯水处理柱子 10 分钟。
3. 用 3 倍介质体积的缓冲液一（0.5 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5）处理柱子 10 分钟。
4. 用 3 倍介质体积的缓冲液二（0.5 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl, pH 4.5）处理柱子 10 分钟。
5. 再重复 3-4 步两次。
6. 用 3 倍介质体积的超纯水处理柱子 3 次。
7. 若需要立即使用, 则用 3 倍介质体积的 1×PBS 缓冲液处理柱子 2 次。堵上漏口, 加 3 倍介质体积的 1×PBS 缓冲液洗涤后立即使用。
8. 若长时间不用, 则上步的 1×PBS 改成 20%的乙醇, 其余操作完全相同。