



版本号：DE250717

GST-tag Protein Purification Kit

GST 标签蛋白纯化试剂盒 I 型（超声裂解法）

产品编号：PTE008

产品内容：

产品成分		PTE008-10T	储存温度
A 包	50%谷胱甘肽-琼脂糖介质（切勿冷冻！）	5 mL	2-8°C
	PBS 缓冲液干粉（PM5090）	2 L/袋	RT
	层析柱（6 mL）	10 个	
B 包	超声裂解缓冲液（仅 I 型提供）	30 mL	-20°C
	酶解液（仅 II 型提供）	2.5 mL×10	
	PMSF（10 mg/mL）	1 mL	
	GST 洗脱液	30 mL	

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。

运输及储存条件： A 包常温运输，B 包蓝冰运输；各组分按照产品内容表中所示温度进行储存，保质期 18 个月。



产品简介：

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。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，是分离纯化 GST 标签蛋白的重要方法。

本试剂盒可用于 10 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-琼脂糖介质，每 mL 介质可吸附~20 mg (40 kDa) GST 标记的蛋白质。本试剂盒只能用于非变性条件下使用，只可用于纯化没形成包涵体的可溶性 GST 标签蛋白。

操作步骤：

一、重组蛋白的表达和细菌收集

1. 将目的质粒转化大肠杆菌表达感受态（Rosetta-DE3(CC555) / BL21-DE3(CC553)等），菌 P 鉴定后挑取单克隆，接种到 3-5 mL 含适当抗生素的 LB 液体培养基中，37°C 培养过夜。
2. 按照 1:100 的比例取培养过夜的菌液，接种到含抗生素的 LB 液体培养基中。
注：具体的培养体积根据需要纯化的蛋白量而定。
3. 37°C 振荡培养直到 OD 600 达到 0.6-0.8。
4. 加入 IPTG 至终浓度为 1 mM，37°C 振荡培养 3 h 或 16°C 振荡培养 18-20 h。
注：首次尝试建议用不加诱导物的菌液做对照。对于特定蛋白的诱导表达，最佳的 IPTG 浓度、诱导温度和时间需要通过实验确定。
5. 4°C，5000 g 离心 10 min 收集 50 mL 表达菌液，弃上清，收集沉淀。沉淀可直接用于裂解或置于 -80°C 冻存储备。冷冻保存的菌体使用前需置于冰上解冻 15 min。

二、裂解（超声破碎/酶解法，二选一）

1. **超声破碎细菌：**在 50 mL 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。超声参考条件：功率 200-300 W，每次超声处理 10 s，间隔 10 s，共超声处理 15 min。
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。超声参数需根据仪器型号自行摸索优化，裂解物必须不粘稠，否则会堵塞层析柱。



2. **酶法裂解细菌**：在 50 mL 细菌沉淀中加入 2.5 mL 冰浴的酶解液，再加入 25 μ L PMSF（10 mg/mL）溶液，冰上放置 30 min，轻轻涡旋数下，以充分裂解细菌，尽量避免产生气泡。
3. 将超声裂解法或酶解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 标签蛋白。预留少量（如 100 μ L）作为**裂解液**留样，其余用于纯化。

注：上清必须保持澄清才能进行纯化。若混有不溶性杂质会严重影响后续蛋白纯度。

三、谷胱甘肽-琼脂糖介质的平衡

1. 取 0.5 mL 介质于离心管，1,000 g、4°C 离心 30 s，去上清。
2. 加入 1.5 mL 预冷的 1×PBS 缓冲液重悬平衡介质，1,000 g、4°C 离心 30 s 去上清，重复平衡共三次，离心去上清。

注：介质用量需要根据 GST 蛋白产量决定，请根据实验需要取适量的谷胱甘肽-琼脂糖介质进行实验，1×PBS 缓冲液平衡介质体积按照比例进行增减。

四、纯化

1. 加入裂解步骤中获得的上清液，将介质重悬均匀后在 4°C 侧摆摇床或水平摇床上结合 1-12 h（初次操作结合时间可设置在 2-4 h 检测结合效果后进行调整）。
2. 放一片筛板至层析柱并盖上底部盖子，用**剪去尖端的**枪头吸取上清与介质混合液装入层析柱，填入过程中尽量避免产生气泡。
3. 将纯化柱底部的盖子打开，使层析柱内液体自然流出，收集并保存约 100 μ L **流穿液**用于 SDS-PAGE 电泳。

注：可将流穿液重新加入此层析柱中 3-5 次，以提高结合率。

4. 用 2 mL 1×PBS 缓冲液洗掉未结合的杂蛋白，收集并保存**洗杂液**（含杂蛋白），预留 100 μ L 作为 SDS-PAGE 电泳留样，其余在确认实验成功后再丢弃。

注：经 SDS-PAGE 检测纯化结果后，若有需要，也可增加 1 次洗杂次数。

5. 用 0.5 mL 的 GST 洗脱液洗柱 3-5 次，收集并保存**洗脱液**，此洗脱液即**纯化的 GST 标签蛋白样品**。收集并保存每次洗脱液，进行 SDS-PAGE 电泳，根据电泳结果中蛋白洗脱情况增减洗脱次数。



注：由于纯化样品可能含蛋白酶污染，不能在 4°C 长期保存，需留 100 μL 左右用于后续浓度测定或 SDS-PAGE 电泳，其余放 -80°C 保存。

6. 将裂解液留样（二-3）、流穿液留样（四-3）、洗杂液留样（四-4）和洗脱液留样（四-5）进行蛋白定量或 SDS-PAGE 跑胶分析。

注：由于本操作没有预先脱盐，故只能用 Bradford 法或 OD 检测法测定蛋白浓度。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 标签蛋白将比天然蛋白大 26 kD。

SDS-PAGE 跑胶结果分析：

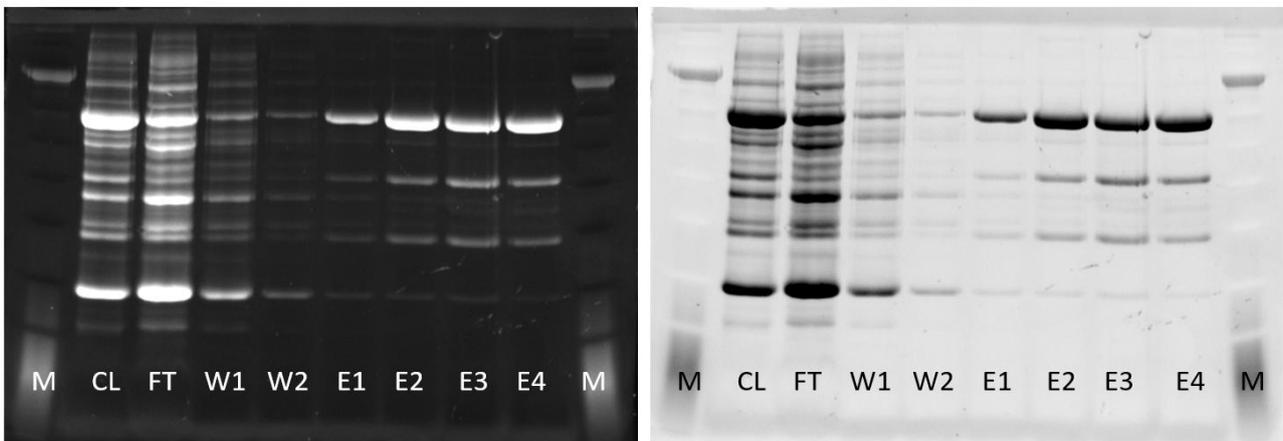


图 1. GST 标签蛋白纯化效果图。M: Marker; CL: 细菌裂解液; FT: 流穿液; W1-W2: 洗杂液 1-2; E1-E4: 洗脱液 1-4。注：实际的电泳结果会因样品、上样量等的不同而有所不同。实验凝胶使用酷来搏 10% 一步法免染 PAGE 凝胶 (SK62110)，蛋白分子量标准为 10-180 kDa 预染蛋白 Marker (DM2616)。

裂解液：目的是检测裂解效果以及蛋白表达的效果。

跑胶应该能看到包括目标蛋白在内的所有蛋白条带，目标蛋白条带应最浓最亮。如不然则需调整超声/酶解破碎、蛋白诱导表达的条件，解决方案见“常见问题与解决建议（1）”。

流穿液：目的是检测目标蛋白与谷胱甘肽-琼脂糖介质的结合情况。

此时的目标蛋白应被介质结合在层析柱中，跑胶结果中目的蛋白越少越好。蛋白与纯化介质结合效率低，解决方案见“常见问题与解决建议（2）”。

洗杂液：目的是洗掉层析柱中剩余的未结合的杂蛋白。跑胶结果应与流穿液相似。

洗脱液：此时洗脱下来的是纯化的目的蛋白。

洗脱效率和结果有杂带的解决方案见“常见问题与解决建议（3），（4）”。



五、再生（自备试剂，自选步骤）

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. 再重复两次步骤 3-4。
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。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。

常见问题与解决建议：

1. 裂解液中目的蛋白含量低

- （1）感受态活力不足，重新转化大肠杆菌表达感受态。
- （2）调整蛋白表达条件：如 IPTG 浓度、诱导温度和时间等。
- （3）诱导表达的蛋白迅速降解：设置不同的诱导表达时间，摸索细菌培养、蛋白表达和降解的时间，最终选择适当的诱导时间。若蛋白是在细菌裂解后降解，则需调整加入蛋白酶抑制剂。在蛋白纯化的所有步骤中，须保持在 4°C 左右，以尽量减缓蛋白降解。
- （4）目的蛋白表达在菌体沉淀（包涵体）中：需调整表达条件（如降低蛋白表达的温度和使用较低浓度的 IPTG 诱导蛋白），使目的蛋白至少部分实现可溶性表达。或使用本公司包涵体蛋白溶解及复性试剂盒（PTE003）溶解包涵体后，然后再进行纯化。

2. 蛋白与纯化介质结合效率低

- （1）样品上样过程中的流速过高：上样过程中需保持低流速以获得最大结合能力。
- （2）蛋白与介质结合时间短：增加四-1 步骤中蛋白与纯化介质的结合时间，可以过夜结合。



- (3) GST 标签蛋白被机械裂解变性（比如超声）：超声强度过高会导致融合蛋白变性，从而不能很好地与介质结合。此时宜使用温和的超声条件，且超声过程必须在冰浴中进行。
- (4) GST 标签蛋白被过度稀释：重新浓缩样品，增加蛋白浓度。
- (5) 层析柱使用次数过多，杂质干扰：层析柱再生或使用新的层析柱。
- (6) 平衡时间太短：确认介质至少用 3 倍柱体积的 PBS 缓冲液平衡过。

3. 纯化获得的 GST 标签蛋白经 SDS-PAGE 电泳检测有较多杂带

- (1) 降低超声强度：细胞破碎效果可以通过溶液的澄清度或显微镜下观察细菌形态来判断。过度超声可能会导致宿主蛋白的变性及与 GST 标签蛋白的共纯化。
- (2) 杂蛋白和目的蛋白结合过强：尝试在洗柱液 PBS 中加 1% TritonX-100 和 500 mM NaCl。

4. GST 标签蛋白不能被高效洗脱

- (1) 洗脱缓冲液的体积不够：增加洗脱缓冲液的体积。
- (2) 洗脱时间不够：通过降低洗脱过程中的流速来增加洗脱时间。
- (3) 洗脱不彻底：增加重复洗脱次数。
- (4) 提高洗脱缓冲液的 pH：在洗脱效率较低时，可以尝试提高洗脱缓冲液的 pH 至 9.0。
- (5) 向洗脱缓冲液中加入非离子型去垢剂：非特异的疏水作用可能会使蛋白沉淀，并阻止目的蛋白的洗脱。在此情况下，加入适当的去垢剂可能会有所改善。向洗脱缓冲液中加入终浓度为 0.1% 的 Triton X-100，能够显著改善某些 GST 标签蛋白的洗脱。

注意事项：

1. 请勿在 -20°C 或更低温度冷冻保存谷胱甘肽-琼脂糖介质。
2. 保存和纯化过程中应始终保持纯化凝胶介质湿润。
3. 纯化过程中的各步骤留样体积根据具体纯化体积确定，仅供参考。
4. 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 μm 的滤膜过滤。
5. GST 标签蛋白的纯化应始终保持在非变性条件下，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，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，例如 SL1086 蛋白酶抑制剂混合物（细菌，100×）或 SL1088 蛋白酶-磷酸酶复合抑制剂（100×）。

6. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得存放于普通住宅内。

7. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

相关产品：

产品名称	货号
pET28a(+)/ pET-32a(+)	VT060/ VT033
Rosetta (DE3) 感受态细胞	CC555
BL21 (DE3) 感受态细胞	CC553
1 M IPTG 溶液	SL3861
包涵体蛋白溶解及复性试剂盒	PTE003
一步法免染 PAGE 凝胶快速制备试剂盒	SK62106/62108/62110/62112/62115
SDS-PAGE 快速电泳液缓冲液	PM5063/SL1211
即沉型 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液（无气味）	SL11706
双色预染蛋白 Marker（10-250 kD，11 条带）	DM2618
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	SK1070
His 标签蛋白纯化试剂盒（超声裂解/酶解）	PTE006/007