

●产品简介

GST Sepharose 纯化树脂系采用进口填料分装而成，可快速、温和，特异性地纯化包含谷胱甘肽结合序列的非变性蛋白质，如谷胱甘肽-S-转移酶（GST）、谷胱甘肽过氧化物酶等，尤其适用于在大肠杆菌、昆虫细胞和哺乳动物细胞中表达的 GST 融合表达蛋白。性质稳定，重复性好，使用简单、方便。胶粒平均直径 60 微米，比表面积大，结合大肠杆菌重组 GST 蛋白的能力大于 8 mg/ml。可以满足大多数实验室级别小量纯化 GST 融合蛋白以及 GST Pull-down 实验所需。

●需要配置的溶液：

10×STE Buffer (Lysis Buffer, 1L)

100 mM Tris-HCl 12.1g Tris (MW 121g/mol)
10 mM EDTA 3.72g C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈•2H₂O(MW372.24g/mol)
1500 mM NaCl 87.7g NaCl(MW68.08g/mol)
HCl调整PH至8.0，滤膜过滤

10×PBS(Wash Buffer, 1L)

500mM Na₂HPO₄ 69.0g Na₂HPO₄•H₂O(MW 137.99g/mol)
1500mM NaCl 87.7g NaCl(MW68.08g/mol)
NaOH调整PH至7.4，滤膜过滤

10×Elution Buffer (1L)

100 mM Tris-HCl 12.1g Tris (MW 121g/mol)
10 mM EDTA 3.72g C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈•2H₂O(MW372.24g/mol)
1500 mM NaCl 87.7g NaCl(MW68.08g/mol)
200 mM GSH(谷胱甘肽) 61.4g NaCl(MW307.33g/mol)
NaOH调整PH至8.0，滤膜过滤

10% Triton X-100

100g Triton X-100 补充1× STE Buffer至1000ml

2XSDS-PAGE样品Buffer

0.09M Tris-Cl,PH 6.8; 20%甘油 (glycerol); 2%SDS; 0.02%溴酚蓝; 0.1M DTT

5×Regeneration buffer I (1L)

0.5M Tris-HCl 60.5g Tris (MW 121g/mol)
2.5M NaCl 170g NaCl(MW68.08g/mol)
pH8.5

5×Regeneration buffer II (1L)

0.5M sodium acetate 41g(CH₃COONa•3H₂O MW 82.03)
2.5M NaCl 170g NaCl(MW68.08g/mol)
adjusting pH4.5 with acetate

●操作步骤

I 细胞抽提物的制备

1. 诱导靶蛋白表达

分别挑取对照菌和重组菌1~2个菌落，接入5ml含抗生素的LB培养液，37℃振荡培养过夜。取5ml过夜培养物接入500ml含抗生素的LB培养液，37℃振荡培养2h以上，至对数中期 (A₆₀₀=0.5~0.8)。向诱导管中加入IPTG使其浓度达到1mmol/L，37℃振荡培养5h左右

2. 3000 g, 4℃离心10 min, 弃去培养基, 收集菌体, 重悬于冰上预冷的PBS Buffer 中(每50ml 培养液加3ml PBS)。

3. 3000 g, 4℃离心10 min, 弃去PBS Buffer。**注：此时可以-80℃或 -20℃，长期保存。**

4. 40 ml STE Buffer 重悬菌体。加入溶菌酶终浓度1mg/ml, 冰浴10分钟

5. 加入终浓度1mM的DTT, 冰上超声破碎10分钟, 直至样品不再粘稠, 成透明状。12000rpm, 4℃离心20分钟, 并将上清(可溶部分)转移至一干净的离心管中。加入10 ml 10% Triton X-100 至终浓度2%, 室温30分钟。

6. 分别取10ul上清和沉淀悬液进行SDS-PAGE 电泳检测。若目的GST 融合蛋白形成包涵体(不可溶蛋白), 应在纯化以前以适当的方式进行溶解和重折叠。

II GST融合蛋白的纯化

1. 轻轻混匀GST凝胶直至完全重悬。

2. 用吸管移取适量的GST凝胶至层析柱中。

3. 用10倍柱床体积的PBS Buffer洗涤柱子。

4. 将含有GST融合蛋白的PBS溶液加入到已平衡好的层析柱中, 流速控制在2-3cm/h。**注意：样品在上柱前需0.45 μm微孔滤膜过滤。**

5. 上样完成后, 用20倍柱床体积的PBS洗涤, 洗涤液中最好加入蛋白酶抑制剂如PMSF以抑制蛋白酶活性。

6. 用10-15倍柱床体积的新鲜配制的洗脱缓冲液洗脱GST融合蛋白, 并通过观察280nm处的吸收值来监控融合蛋白的洗脱情况。

7. 分别取等量的流穿液, 洗涤液和洗脱收集液进行SDS-PAGE以分析目的蛋白。

8. 洗脱完成后, 用3-5倍柱床体积的1XPBS Buffer洗涤柱子。

9. 用3-5倍柱床体积的去离子水洗涤柱子, GST凝胶最后保存在2-3倍柱床体积的20%乙醇中。

III GST纯化柱再生

GST纯化柱可重复使用多次，不需再生。若需纯化不同的蛋白，需按如下方法进行再生。

1. 用2倍柱床体积的1xRegeneration buffer I 1洗涤柱子。
2. 用2倍柱床体积的Regeneration buffer II 洗涤柱子。
3. 用3-5倍柱床体积的1x PBS Buffer重新平衡柱子。

【常见问题】

问题	可能原因	解决办法
纯化不到GST融合蛋白	融合蛋白是包涵体	降低表达温度（16-22℃），降低IPTG诱导浓度（10-100 μM），缩短诱导时间（2-5小时）。 做包涵体复性，或者换一种表达载体。
	融合蛋白不能结合GST-resin	增加目标蛋白和GST-resin结合的时间，多次过柱。
	融合蛋白GST没有活性	调整破菌条件，超声产生的热量可能使GST蛋白变性。
	融合蛋白被蛋白酶降解	在破菌缓冲液中加入蛋白酶抑制剂，缩短纯化时间，降低温度。
	融合蛋白不能从柱子上洗脱	把洗脱GSH浓度提高，同时调整洗脱缓冲液pH到8.0-9.0；增加NaCl浓度。
洗脱的目标蛋白有大量杂带	虽然GST蛋白本身的稳定性很好，但融合蛋白有可能在表达过程中就发生降解	可以使用抗体检测具体在纯化的哪一步发生降解。通常在破菌缓冲液中加入蛋白酶抑制剂、缩短纯化时间、降低培养温度会有帮助。
	有些宿主细胞的分子伴侣蛋白会与融合蛋白结合	上样前加入5 mM DTT，或者使用10 mM MgSO ₄ 50 mM Tris, 2 mM ATP先反应20分钟，让伴侣蛋白去结合。
	超声裂菌过度，目标蛋白被打断	注意超声仪的工作功率以及超声时间，使用显微镜控制裂菌。
	GST-resin可能有非特异性吸附	在上样缓冲液中加入去垢剂，可以有多种选择：1% TritonX-100、1% Tween-20、0.03% SDS或者0.1% NP-40。

GST Sepharose

——GST-tagged重组蛋白纯化填料

货号	产品名称	规格	备注
Cat: DC341	GST	10ml	50% GST 悬液, 含有20% 乙醇作防腐剂。常温运输,
Cat: DC342	Sepharose	50ml	4℃ 保存 (禁止冻结)
Cat: DC343		100ml	
Cat: DC344		1000ml	

贮存条件:

低温运输, 4℃贮存, 有效期一年。

生产日期: 见包装