

M5 Glutathione-Sephrose Resin GST 琼脂糖凝胶使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Glutathione-Sephrose Resin	10ml	MF204-01

【STORAGE】

Store at 4°C. Stable for one year from the date of shipment.

【产品简介】

本产品为基于三甘醇（16 原子间隔臂）的谷胱甘肽琼脂糖，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。该填料具有很好的物理和化学稳定性，使用寿命长，使用方便，批次重复性好，可一步分离得到纯度较高的目标蛋白，纯化条件温和，可以保证蛋白的活性。

支持物：CL-6B 琼脂糖凝胶

载量：5-10 mg GST 标签蛋白/ml 填料

粒径：50-160 μm 。

【注意事项】

1. 请勿将 GST 琼脂糖凝胶冷冻、干燥和离心，整个纯化过程中切忌凝胶脱水变干。
2. 蛋白层析应使用高纯度的试剂和水，层析前缓冲液应用 0.45 μm 滤膜过滤后使用。另外为防止柱子阻塞，上柱前建议将裂解液进行离心，或者使用 0.45 μm 滤膜过滤。
3. GST 融合蛋白与还原型谷胱甘肽的结合比较缓慢，为获得最大结合量，上样流速建议为：0.2-1 ml/min (6 ml 层析柱)，0.5-2 ml/min (12 ml 层析柱)。对于吸附效果不好的样品，可以先把介质和样品混合，轻轻振摇 2-4 小时，再装柱，用平衡缓冲液进行重新平衡、洗脱等操作，另外在细菌抽提试剂中添加 5 mM DTT，可以显著提高 GST 标签结合能力。
4. 不同的 GST 融合蛋白取得最佳纯化效果所需还原型谷胱甘肽浓度、洗脱体积和洗脱时间可能有所不同。必要时需对流产液、洗脱液进行 SDS-PAGE 以及 Western 杂交分析，以确定最佳纯化条件。
5. GST 融合蛋白以包涵体形式存在时不能与介质结合，必须先进行变性、复性、透析处理后才能用介质进行纯化。建议优化蛋白表达条件尽量使蛋白可溶性表达。
6. 如后续实验需要除去洗脱液中还原型谷胱甘肽，可采用超滤或透析的方法。

【操作步骤】**A、缓冲液的准备**

1. 结合缓冲液 (PBS): 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH7.4
2. 洗脱缓冲液: 10mM Na_2HPO_4 , 1.8mM KH_2PO_4 , 140mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM 还原型谷胱甘肽 (GSH), pH7.4。将 0.1g 还原型谷胱甘肽 (GSH) 溶于 30ml 结合缓冲液, 或将 0.25g 溶于 75ml 结合缓冲液中。
3. 再生缓冲液 1: 0.1M Tris-HCl, 0.5M NaCl, 0.1% SDS, pH8.5
4. 再生缓冲液 2: 0.1M Sodium acetate, 0.5M NaCl, 0.1% SDS, pH4.5

B、样本制备

1. 收集菌体后, 每 100mg 菌体 (湿重) 加 1-5ml 细菌蛋白抽提试剂 (每 1ml 细菌蛋白抽提试剂中加入 10 μl 蛋白酶抑制剂混合物), 如有需要可以超声裂解菌体。

注意: 1) 当提取物粘度高时, 建议加入 DNaseI 和 Lysozyme。每 1ml 细菌抽提试剂中加入 1 μl DNaseI (1,000U/ml), 2 μl Lysozyme (50mg/ml), DNase I 和 Lysozyme 可以单独从我公司购买。或者直接从我公司购买细菌蛋白抽提试剂盒 (货号 MF185-01)。

2) 超声过程中保持菌液处于冰浴中, 超声条件依赖于所使用的超声仪功率, 探头种类, 容器的大小形状, 需实验中摸索, 应避免连续超声导致溶液过热, 可分成短时间, 多次超声, 最终以菌液变清即可。

2. 10,000rpm, 4°C 离心 15 分钟, 将上清转移到新的已经预冷的离心管中, 然后用预冷的 PBS Buffer 重悬沉淀 (每 50ml 裂解液的沉淀加入 3ml 的 PBS)。
3. 分别取 10 μl 上清和沉淀悬液进行 SDS-PAGE 电泳检测, 以确定蛋白存在于上清或沉淀中, 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。

C、组装层析柱

1. 将 Glutathione-Sepharase Resin 混合均匀直至重悬, 用吸管移取适量的填料至层析柱中。室温静置 10 分钟, 待凝胶与溶液分层后, 把底部的出液口打开, 让乙醇通过重力作用缓慢流出。

注意: 1) 填料的上层是乙醇保护液, 将填料与乙醇一起混匀, 以每 ml 填料纯化 5-10mg GST 标签蛋白计算, 取需要的填料与乙醇混合液加入层析柱中。

2) 如果乙醇不流出, 可以给柱子一个外力, 例如用大拇指对柱口轻轻按压一下, 迫使乙醇流出。

3) 本实验都是通过重力作用使溶液流出。

2. 加入 5 倍柱体积的去离子水洗涤, 再用 10 倍柱体积的结合缓冲液平衡, 平衡结束后即可上样。

注意: 柱体积指的是填料的体积。

D、GST 融合蛋白的纯化

1. 将层析柱的出口连接上紫外蛋白监测仪，根据紫外蛋白监测仪观察 280 nm 处的吸收值来监控层析柱流出蛋白情况。
2. 上样：将制备的蛋白样品用结合缓冲液等体积稀释后，加入到已平衡好的层析柱中，建议上样流速为：0.5-1 ml/min (6 ml 层析柱)，1-2 ml/min (12 ml 层析柱)。观察 280 nm 吸收情况并收集流穿蛋白。

注意：1) 样品在上柱前可以离心或 0.45 μm 微孔滤膜过滤。或者使用本试剂盒中附带的一块筛板，使用时先将筛板加至填料的上层，该筛板可用于杂质较多的蛋白的过滤，防止过多的杂蛋白堵塞柱子的作用。再将处理好的样品负载上柱，但是筛板放入柱子后就不易取出。

2) 通过控制加入的菌体裂解液的速度或流出速度来控制柱流速，流速过快会影响柱效。

3. 洗涤：使用 10 倍柱体积的结合缓冲液过柱，洗涤杂蛋白，观察 280 nm 吸收情况并收集杂蛋白。建议洗涤流速为 0.5-1 ml/min (6 ml 层析柱)，1-2 ml/min (12 ml 层析柱)。

注意：建议洗涤液中加入蛋白酶抑制剂终浓度为 1mM，如蛋白酶抑制剂混合物，以抑制蛋白酶活性。

4. 洗脱：使用 10-15 倍柱体积的新鲜配制的洗脱缓冲液过柱，洗脱目的蛋白，观察 280 nm 吸收情况并收集目的蛋白。建议洗涤流速为 0.5-1 ml/min (6 ml 层析柱)，1-2 ml/min (12 ml 层析柱)。
5. 蛋白检测：分别取等量的流穿液，洗涤液和目的蛋白洗脱液进行 SDS-PAGE 以分析蛋白的层析情况。
6. 洗脱后，依次用 3-5 倍柱体积的结合缓冲液和 3-5 倍柱体积的去离子水洗涤填料，再用 2-3 倍柱体积的 20%乙醇洗涤（乙醇要将填料浸没），封柱后 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

E、柱再生

当填料使用多次后，结合效率会有下降，可用以下方法再生，提高填料的使用寿命和蛋白质的结合效率。

1. 使用 5 倍柱体积的再生缓冲液 1 洗涤填料，而后用 5-10 倍柱体积超纯水洗涤。
2. 使用 5 倍柱体积的再生缓冲液 2 洗涤填料，而后用 5-10 倍柱体积超纯水洗涤。
3. 保存：使用 2-3 倍柱体积的 20%乙醇洗涤，将层析柱的头尾密封后（乙醇要将填料浸没）2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存。
4. 再次使用时加入 5 倍柱体积的去离子水将乙醇洗涤后，使用 10 倍柱体积的结合缓冲液平衡填料，平衡结束后即可上样。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。