

蛋白质研究

CAT#: 111116-20

常温运输和保存, 三个低温成分

TIANDZ

一站式 GST 标记蛋白质微量纯化套装

one-Stop GST-Tagged Protein Miniprep Pack

使用手册 V1.2

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

<p>原理及特点</p>	<p>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 标记蛋白质的重要方法。本产品就是专门用于上述目的, 具有下列特点:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 一站式套装, 含所需的谷胱甘肽介质、溶液和层析柱, 用户只需要提供表达 GST 标记蛋白的细菌 (酵母、杆状病毒、培养细胞) 即可, 非常方便。 2. 专一性强, 一次过柱即可获得纯度高达 95% 的 GST-标记蛋白。 3. 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。 4. 每次可以处理 20 mL 的表达菌液, 适合初步筛选和鉴定。 5. 提供 4 mL 浓度为 50% 的谷胱甘肽-Agarose 介质, 可吸附 5-10 mg GST 标记蛋白质。 6. 本介质可以反复使用多次。 																																															
<p>规格及成分</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>编号</th> <th>小扁盒包装</th> <th>保存</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>谷胱甘肽-琼脂糖介质, 50%</td> <td>120101</td> <td>4 mL</td> <td>2-8℃</td> </tr> <tr> <td>10×PBS 缓冲液</td> <td>100215</td> <td>100 mL</td> <td>常温</td> </tr> <tr> <td>GST 标签蛋白纯化溶液 A</td> <td>111116a</td> <td>1 mL</td> <td>常温</td> </tr> <tr> <td>GST 洗脱缓冲液成分一</td> <td>111116b1</td> <td>25 mL</td> <td>常温</td> </tr> <tr> <td>GST 洗脱缓冲液成分二</td> <td>111116b2</td> <td>80 mg</td> <td>常温</td> </tr> <tr> <td>溶菌酶 (20 KU/mg)</td> <td>100406</td> <td>30 mg</td> <td>-20℃</td> </tr> <tr> <td>Benzonase (1U/uL)</td> <td>101001</td> <td>100 uL</td> <td>-20℃</td> </tr> <tr> <td>PMSF (10 mg/mL)</td> <td>100853</td> <td>1 mL</td> <td>-20℃</td> </tr> <tr> <td>6 mL 层析柱(带筛板)</td> <td>110809</td> <td>1 套</td> <td>常温</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>111116sc</td> <td>1 份</td> <td>常温</td> </tr> </tbody> </table>				成份	编号	小扁盒包装	保存	谷胱甘肽-琼脂糖介质, 50%	120101	4 mL	2-8℃	10×PBS 缓冲液	100215	100 mL	常温	GST 标签蛋白纯化溶液 A	111116a	1 mL	常温	GST 洗脱缓冲液成分一	111116b1	25 mL	常温	GST 洗脱缓冲液成分二	111116b2	80 mg	常温	溶菌酶 (20 KU/mg)	100406	30 mg	-20℃	Benzonase (1U/uL)	101001	100 uL	-20℃	PMSF (10 mg/mL)	100853	1 mL	-20℃	6 mL 层析柱(带筛板)	110809	1 套	常温	使用手册	111116sc	1 份	常温
成份	编号	小扁盒包装	保存																																													
谷胱甘肽-琼脂糖介质, 50%	120101	4 mL	2-8℃																																													
10×PBS 缓冲液	100215	100 mL	常温																																													
GST 标签蛋白纯化溶液 A	111116a	1 mL	常温																																													
GST 洗脱缓冲液成分一	111116b1	25 mL	常温																																													
GST 洗脱缓冲液成分二	111116b2	80 mg	常温																																													
溶菌酶 (20 KU/mg)	100406	30 mg	-20℃																																													
Benzonase (1U/uL)	101001	100 uL	-20℃																																													
PMSF (10 mg/mL)	100853	1 mL	-20℃																																													
6 mL 层析柱(带筛板)	110809	1 套	常温																																													
使用手册	111116sc	1 份	常温																																													
<p>运输及保存</p>	<p>常温运输和保存, 谷胱甘肽-琼脂糖介质需常温运输 4℃ 保存, 溶菌酶、Benzonase 和 PMSF 需低温运输, -20℃ 保存。有效期一年</p>																																															
<p>自备试剂</p>	<p>超纯水</p>																																															
<p>使用方法</p>	<p>一:重组蛋白的表达和细菌收集</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 37℃ 振荡培养 20 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℃ 振荡培养 3 小时或 22℃ 振荡培养 8 小时 (或过夜)。 3. 4℃ 5000 g 离心 10 分钟收集 20 mL 表达菌液, 弃上清。 																																															

4. 用 1×PBS 缓冲液重悬细菌沉淀，4℃ 5000 g 离心 10 分钟，弃上清。沉淀可直接用于裂解或放-80℃保存。1×PBS 缓冲液可用自备的超纯水稀释本试剂盒提供的 10×PBS 缓冲液而得。PBS 缓冲液极其容易长细菌，注意防止污染。

二：细胞裂解

5. 如果用超声波破碎细胞，先用 1 mL 冰浴的新鲜配制的细胞裂解液重悬细菌沉淀（细胞裂解液的配制方法：在 1 mL 1×PBS 缓冲液中加入 50 uL 溶液 A 和 50 uL 10 mg/mL 的 PMSF 溶液，混匀即可）。冰上超声裂解重悬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，一般选 1K-10K 频率处理 15 次，每次 20 秒，间隔 1 分钟（必需放置在冰上）。裂解物不能粘稠，否则会堵塞层析柱。
6. 如果用酶法破裂细胞，则在 1 mL 冰浴的、新鲜配制的细胞裂解液重悬细菌（细胞裂解液配制方法：在 1 mL 1×PBS 缓冲液中加入 1.5 mg 溶菌酶干粉、50 uL 10 mg/mL 的 PMSF 溶液和 5 uL Benzonase 溶液，混匀即可）。将重悬细菌冰上放置 30 分钟，得到细菌裂解物。
7. 将超声或酶法得到的细胞裂解物在 13000 g 4℃离心 10 分钟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 100uL）作为裂解液留样，其余用于第 10 步的过柱。

三：层析柱的制备和 GST 蛋白纯化

8. 摇晃将 4mL 谷胱甘肽-琼脂糖介质充分混匀后，全部加入到预放了一片筛板的层析柱中（介质的最低用量需要根据 GST 蛋白产量决定，100 mL 菌液最少需要使用 200 uL 介质。此处加 2mL 则绰绰有余）。下列步骤各溶液的用量均针对 4mL 介质而定，如果介质用量不同，各溶液用量需相应调整。
9. 用 40 mL 预冷的 1×PBS 缓冲液洗柱。
10. 将第 7 步得到的上清液（含可溶性 GST 标记蛋白）上柱，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。GST 和谷胱甘肽之间的结合很缓慢，所以流速一定不能快，否则结合不充分。流速一般在 0.2-1 mL/分钟即可。如要提高 GST 标记蛋白与介质的结合效率，可用本试剂盒提供的红盖将层析柱下的漏液口堵上，让细菌裂解液和介质在 4℃结合 30 分钟或过夜。也可以将穿透液反复上柱。
11. 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 100uL 作为穿透液留样，其余在确认实验成功后再丢弃。
12. 用 0.2-0.5 mL GST 洗脱液洗柱，收集并保存穿透液，此穿透液即纯化的

	<p>GST 标记蛋白样品。GST 洗脱液的配制方法是将约 80mg GST 洗脱液成分二干粉全部加入到 GST 洗脱液成分一溶液中，摇晃直到干粉全部溶解即得 GST 洗脱液，分装成小份放-20℃保存，每次用一管。由于它可能含蛋白酶污染，所以纯化样品不能在 4℃长期放置，需留 100uL 左右用于后续浓度测定或/和 SDS-PAGE 电泳，其余放-80℃长期放置。</p> <p>13. 用裂解液留样（第 7 步）、穿透液留样（第 11 步）和纯化样品留样（第 12 步）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 OD280 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。</p> <p>附：GST 柱的恢复（本试剂盒不含所需试剂）</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 用 3 倍介质体积的 6 M 盐酸胍处理柱子 10 分钟。介质为 2mL 则用 6mL，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 TrisHCl, 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 TrisHCl, 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。
<p>疑难解答</p>	<p>Q: 为何 GST 蛋白不与介质结合或结合很弱?</p> <p>A: 可能原因及解决办法: 标签蛋白变性 (使用温和裂解方法)、标签蛋白聚集 (补加 DTT)、标记蛋白浓度太低 (浓缩样品)、标记蛋白改变了 GST 的构型 (降低结合时的温度)、结合时间太短 (延长蛋白与吸附柱的结合时间)。</p>
<p>关联产品</p>	<p>一站式 His 标记蛋白纯化试剂盒 (CAT#: 100102)</p>