

GST 标签蛋白纯化试剂盒

货号：PTE008/PTE009-2T

使 用 说 明 书

保存温度：按产品成分说明保存，有效期一年。

产品内容：

Components	PTE008/PTE009-2T	保存
谷胱甘肽-琼脂糖介质（50%）	5 mL	4℃
1×PBS 缓冲液	500 mL	RT
超声裂解缓冲液(仅 I 型提供)	5 mL	-20℃
酶解液(仅 II 型提供)	5mL	-20℃
PMSF(10mg/mL)	1 mL	-20℃
GST 洗脱液	2 mL	-20℃
层析柱（12mL）	2 个	RT
说明书	1 份	

注意：I 型（PTE008）为超声裂解法，II（PTE009）型为酶解法。均适用于可溶性和包涵体中 His 标签蛋白的纯化。

产品说明：

1. 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。
2. 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。
3. 提供 5 mL 浓度为 50%的谷胱甘肽-Agarose 介质，可吸附 5-20 mg GST 标记蛋白质。
4. 本试剂盒可用于 2 次 GST 蛋白纯化（50mL 体积的细菌）。

操作步骤：

一：重组蛋白的表达和细菌收集

1. 37℃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 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 50mL 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 uL 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 125 uL 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 100uL) 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 100uL 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 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°C 长期放置。
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 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。

五：谷胱甘肽层析柱的恢复资料（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 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。