

一般实验室研究使用，不适用于 *诊断和治疗*

GST-Resin 纯化柱

目录号: **D-PAG001-001C (1ml)**
D-PAG001-005C (5ml)
D-PAG001-010 (10ml)
D-PAG001-100 (100ml)

操作手册

在您收到订购的产品时，请确认操作手册是配套的！

如您在实验过程中有新的创意操作可

反馈信箱: tech@aderr.com

2011年10月，第1版



艾德科技 (北京) 有限公司
A&D Technology Corporation

地 址: 北京昌平区中关村生命科学园东 60 米 (102206)

电 话: 010-52406250

传 真: 010-52406250

网 址: www.aderr.com

Email: tech@aderr.com



艾德科技 (北京) 有限公司
A&D Technology Corporation

产品介绍:

GST-resin 是共价偶联了还原性谷胱甘肽的交联琼脂糖微球,用于纯化具有 GSH 结合活性的谷胱甘肽转移酶 (GST) 以及其融合蛋白。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 8mg/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。

使用说明:

1. 离心收集250 ml表达目标蛋白的大肠杆菌,冻融或超声破菌于10-15 ml破菌缓冲液。破菌缓冲液: 20-50 mM Tris-HCl, pH 7.5-8.5, 含0.25 M NaCl, 其它常用缓冲液为PBS。这一步可以适当加入EDTA, PMSF等蛋白酶抑制剂。
2. 离心取上清,上样于预先使用10倍柱体积破菌缓冲液平衡好的纯化柱,通常自然流速可以很好结合。少数情况下,流速过慢,可以使用硅胶管控制上样速度。
3. 样品上样完成以后,使用破菌缓冲液洗柱10-20个柱体积,注意将纯化柱侧壁上的残留样品洗干净。
4. 使用2-6 ml洗脱缓冲液将样品从GST-resin纯化柱上洗脱。洗脱缓冲液: 破菌缓冲液中补加新配制还原型谷胱甘肽 (GSH) 到终浓度6 mM, 10 mg GSH 干粉可配制5 ml洗脱缓冲液。如果样品量较多,可以使用大体积纯化柱,洗脱液的体积适当增加
5. 纯化结束以后,使用大量纯水洗柱封闭上下两端以后保存在4℃,避免让柱子干裂或者冻结。如果需要再次用于纯化其它蛋白,建议使用8M尿素或者6M盐酸胍处理树脂
6. 样品洗脱以后。需要及时使用蛋白超滤管浓缩以及切换缓冲液,并选择适

当条件保存目标蛋白。

补充说明:

1. 在未知GST融合蛋白稳定性的情况下,整个纯化过程最好在4℃完成,可以使用蛋白酶抑制剂防止降解。此外,可以在缓冲液中补加非离子去垢剂改善结合,具体使用浓度参考以下: 1% Triton X-100, 1% Tween-20, 1% CTAB, 10 mM DTT, 0.03% SDS, 0.1% NP-40。
2. 纯化不同的融合蛋白请使用不同的柱子,每根1ml的GST-resin亲和柱一次可以结合大约10 mg GST融合蛋白。
3. 如果GST融合蛋白是包涵体形式,那么只有做了复性以后,才可以使用GST-resin纯化,通常的复性过程耗时、耗力,并不容易成功。
4. 洗脱缓冲液中的GSH浓度不要太高,否则会改变洗脱缓冲液的pH,通常4-10 mM就足够了。注意高浓度GSH具有较强酸性,可能让蛋白失活沉淀。
5. 可以使用在柱酶切的方法,得到去除GST的目标蛋白。经常使用的酶包括: Thrombin; Enterokinase; TEV protease; PPase等。我们推荐TEV protease和PPase,因为这两种酶的特异性较好,都是带有Tag的重组酶,方便除去。其中PPase是和PGEX-6p-1载体配套的酶,效果很不错。
6. 洗脱的缓冲液中含有高浓度的GSH,可能影响后续的实验。请使用超滤管或者脱盐柱进行除去。

常见问题:

GST-resin 亲和柱纯化是最简单的纯化方式之一,通常并不容易出现问題。考虑到例外,我们把一些常见的问题列在下表中,供参考

问题	可能原因	解决方法
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°C), 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。有时候需要调整上样缓冲液的 PH.6-9 之间。也可以尝试加入非离子去垢剂。
	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 浓度提高到 15 mM, 同时调整洗脱缓冲液 pH 到 8.0-9.0; 加入 0.1% TritonX-100; 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 MgSO4 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

相关产品:

DNA样本的制备

货号	品名	规格
A-D1801	全血基因组DNA 提取试剂盒 (离心柱)	50 次 100 次
A-D1901	细胞/组织基因组DNA 提取试剂盒 (离心柱)	50 次 100 次

全基因组/特定基因DNA甲基化定量试剂盒

A-P-1035	DNA甲基化 定量检测试剂盒 (荧光法)	48 次 96 次
A-P-1037	DNA羟甲基化 定量检测试剂盒 (荧光法)	48 次 96 次

其它

A-R1201	高纯总RNA 极速提取试剂盒 (离心柱)	50 次 200 次
A-R3301	通用植物总RNA 极速提取试剂盒 (离心柱)	50 次 100 次