

谷胱甘肽-琼脂糖凝胶 4B (GST 标签纯化树脂) 说明书

货号: AC13411

规格: 5mL/10mL/25mL/50mL

保存: 4℃保存, 有效期至少一年。

产品简介:

pGEX 载体表达的外源蛋白与谷胱甘肽 S-转移酶融合, 因此可以通过谷胱甘肽-琼脂糖亲和层析进行纯化。GSTs 是一类以谷胱甘肽 (γ -谷氨酰半胱氨酰甘氨酸) 作为底物, 通过形成硫醇尿酸失活性小分子的酶。由于 GST 对底物的亲和力是亚毫摩尔级的, 因此谷胱甘肽固化于琼脂糖形成的亲和层析树脂对 GST 及其融合蛋白的纯化效率很高。可以用含游离谷胱甘肽的缓冲液洗脱结合 GST 融合蛋白。树脂用 3mol/L NaCl 的缓冲液再生。

谷胱甘肽琼脂糖对 GST 融合蛋白的结合能力很强 (每毫升柱床体积的树脂能结合 8 毫克融合蛋白)。

特性:

粒度: 45-165 μ m

流速: 75cm/h

工作 PH: 4-10

耐压: 0.3Mpa

载量: >5mg 谷胱甘肽 S-转移酶

使用说明:

谷胱甘肽树脂的处理:

1. 轻轻颠倒盛有谷胱甘肽-琼脂糖树脂的容器, 将树脂混成匀浆。
2. 取部分匀浆放入 15mL 聚丙烯管 (每 100mL 细菌培养物大约需要 2mL 匀浆)。
3. 4℃ 500 g 离心 5 分钟, 小心去掉上清。
4. 在树脂中加入 10 倍柱床体积预冷的 PBS, 颠倒数次混匀, 4℃ 500 g 离心 5 分钟, 小心去掉上清。
5. 每毫升树脂加入 1 毫升冷的 PBS, 制成 50%匀浆, 颠倒数次, 混合均匀, 悬液冰上放置待用。

制备细胞抽提物:

6. 每 100 毫升培养物的细胞沉淀重悬于 4mL PBS 缓冲液中。
7. 加入溶菌酶至终浓度为 1mg/mL, 冰上放置 30 分钟。
8. 用针筒将 10mL 浓度为 0.2%的 TritonX-100 强行注入黏稠的细胞裂解物中, 剧烈振动数次混匀。加入 DNase 和 RNase 至终浓度 5 μ g/mL, 4℃振动温育 10 分钟, 4℃ 3000 g 离心 30 分钟, 去除不溶性细胞碎片, 上清转移到一只新管中, 加入 DTT 至终浓度 1mmol/L。

纯化融合蛋白:

9. 细胞裂解物与适量 50%谷胱甘肽-琼脂糖树脂匀浆混和, 每 100 毫升细菌培养物加 2mL 树脂, 于室温轻摇 30min。
10. 混合物于 4℃以 500 g 离心 5 分钟, 小心去掉上清并留样少许进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。
11. 沉淀中加入 10 倍柱床体积的冷的 PBS, 颠倒离心管数次混匀, 洗去未与树脂结合的蛋白。

12. 4℃以 500 g 离心 5 分钟，小心去掉上清并留样少许进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。

13. 重复步骤 11 和 12 两次。

14. 结合的 GST 融合蛋白可用谷胱甘肽洗脱液洗脱，也可用凝血酶、肠激酶或 Xa 因子切割，释放靶蛋白。

用谷胱甘肽洗脱融合蛋白：

15. 沉淀中加入 1 倍柱床体积的谷胱甘肽洗脱缓冲液，室温轻轻搅动 10min，洗脱树脂上结合的蛋白。

16. 4℃以 500 g 离心 5 分钟，上清（含洗脱的融合蛋白）移至新管中。

17. 重复步骤 15 和 16 两次，合并 3 次上清。

蛋白酶解从结合的 GST 融合蛋白上回收靶蛋白：

18. 在结合了融合蛋白的树脂中加入凝血酶、肠激酶或 Xa 因子（根据融合蛋白中的位点选择），每 mL 树脂加入 50 单位溶于 1mLPBS 的蛋白酶。颠倒离心管数次混匀，室温下振荡 2—16 小时。用小规模实验确定精确时间。

19. 4℃以 500 g 离心 5 分钟，上清小心移至新管中。（GST 仍结合在树脂上，而靶蛋白在上清中，蛋白酶也在上清中，仍需要分离）

20. 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析每一步样品的蛋白质组成。

试剂配制：

谷胱甘肽洗脱缓冲液： 10mmol/L 还原型谷胱甘肽，50mmol/L Tris-Cl (pH8.0)