

谷胱甘肽琼脂糖凝胶使用说明

Pgex 载体表达的外源蛋白与谷胱甘肽 S-转移酶溶合,因此可以通过谷胱甘肽-琼脂糖亲和层析进行纯化。Pgex 是一类以谷胱甘肽 (γ -谷胱甘肽半胱胺酰甘氨酸) 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豪摩尔级的,因此谷胱甘肽固化琼脂糖形成的亲和层析树脂 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)。

1 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 细菌培养物需要 2mL 匀浆);
- (3) 4°C 500 g 离心 5 分钟,小心去掉上清;
- (4) 在树脂中加入 10 倍柱床体积的冷的 PBS,颠倒数次,混合均匀,4°C 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。

2 制备细胞抽提物

- (1) 每 100 毫升培养基的细胞沉淀悬于 4mLPBS;
- (2) 加入溶菌酶至终浓度 1mg/mL,冰上放置 30 分钟;
- (3) 用针筒将 10mL 0.2%TritonX-100 强行注入黏的细胞裂解物中,剧烈振动数次均匀。加入 DNase 和 RNase 至终浓度 5ug/mL,4°C 振动温育 10 分钟,4°C 3000g 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。

3 纯化融合蛋白

- (1) 细胞裂解物与适量 50%谷胱甘肽-琼脂糖树脂匀浆混合,每 100 毫升细菌培养物加 2mL 树脂,于室温轻摇 30min;
- (2) 混合物于 4°C 以 500g 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;
- (3) 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;
- (4) (4) 4°C 以 500g 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;
- (5) 重复步骤 11 和 12 两次;
- (6) 合的 GST 融合蛋白可用谷胱甘肽洗脱缓冲液洗脱,也可用凝血酶、肠激酶或 Xa 因子切割。

4 用谷胱甘肽洗脱融合蛋白

- (1) 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;

- (2) 如步骤 12 离心，上清（含洗脱的融合蛋白）移至管中；
- (3) 重复步骤 a 和 b，合并三次上清。

5 蛋白酶解

- (1) 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。用小规模试验确定精确时间；
- (2) 4℃以 500g 离心 5 分钟，上清小心移至新管中。（GST 仍结合在树脂上，而靶蛋白也在上清中，仍需要奋力）；
- (3) 10%SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析每一步样品的蛋白质组成。

6 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)

特别注意：

上样之前，样品必须去除色素，否则色素会被吸附到填料上，影响填料的正常使用。