

Biolinkedin® GST 标签蛋白纯化试剂盒

包装清单

名称	货号	包装
GST 标签蛋白 纯化试剂盒	PK-2004	盒

产品概述

Biolinkedin® GST 标签蛋白纯化试剂盒是 GST 标签蛋白琼脂糖磁珠和优化预制的缓冲液以及 50mL 的磁力架组成，用于高效、快速纯化 GST 标签融合蛋白。

试剂盒组成

GST 标签蛋白琼脂糖磁珠 (单品货号: L-2004)	10mL (50% v/v)
结合/洗涤缓冲液 (10×)	100 mL
洗脱缓冲液 (待添加 GSH)	10 mL
还原型谷胱甘肽 GSH	184 mg/瓶
蛋白快速染色液	50 mL
SDS-PAGE Sample Loading buffer (5×)	10 mL
磁力架	50mL 双排四孔

注：

1. 使用前配制结合/洗涤缓冲液 (1×)：按照 9 : 1 的比例混合适量结合/洗涤缓冲液，例如 9mL 超纯水和 1mL 结合/洗涤缓冲液 (10×) 混合，混合后的溶液即为结合/洗涤液缓冲液 (1×)。

2. 10XGSH 溶液和洗脱缓冲液的配制

2.1 GSH 溶液 (10×) 的配制：将试剂盒提供的 184mg GSH 用 6mL 本试剂盒提供的洗脱缓冲液 (待添加 GSH) 溶解并混匀，即为 GSH 溶液 (10×)。配制好的 GSH 溶液 (10×) -20℃分装保存，避免反复冻融，一年内有效。

2.2 洗脱缓冲液的配制：按照 9:1 的比例混合适量超纯水和 GSH 溶液 (10×)，例如 9mL 超纯水和 1mL GSH 溶液 (10×) 混合，混合后的溶液即为洗脱缓冲液。由于 GSH 在溶液中容易被氧化而失效，洗脱缓冲液宜现配现用，配制好的洗脱缓冲液 -20℃分装保存，避免分装保存，两周内有效。

操作流程

1. 样品准备

以大肠杆菌表达系统，500mL 诱导菌液为例。

- 1) 4℃离心 30min (4000xg) 收集菌体，弃上清。
- 2) 用预冷**结合/洗涤缓冲液 (1×)**重悬菌体，如果需要，可加入适量的抑制剂，如蛋白酶抑制剂 (PMSF) 或其他蛋白酶抑制剂等。
- 3) 用超声波破碎法在冰上破碎菌体，直到样品破碎完全。
- 4) 4℃离心 20min (12,000xg)，分离上清和沉淀，并过滤除杂。将上清和沉淀留样以备后续检测。

2. 纯化重组 GST 标签融合蛋白

- 1) 将 **GST 标签蛋白琼脂糖磁珠**充分混匀，取 2mL 磁珠悬浮液，置于 50mL 离心管中，再加入 10mL **结合/洗涤缓冲液 (1×)**，充分混匀后，磁性分离，弃上清，重复上述步骤 1 次。
- 2) 将制备好的含有 GST 标签的融合蛋白上清加入到处理好的磁珠中，混匀后将离心管置于混匀仪上，室温孵育 1~2h。(也可置于 2~8℃孵育 2~4h 或者过夜)
- 3) 孵育结束后，将离心管置于磁力架上，磁性分离，吸取上清，作为流穿，置于 2~8℃，以备后续检测。向离心管中加入 15mL **结合/洗涤缓冲液 (1×)**，置于混匀仪混匀 10~15min，然后磁性分离，吸取上清 (保留，以备取样检测)。重复上述步骤 4 次。
- 4) 加入 1mL **洗脱缓冲液**，吹打混匀 10~20 次后，通过磁力架分离上清至 1.5mL 的 Ep 管收集，重复操作，分别收集 5~10 管洗脱液。
- 5) SDS-PAGE 检测

将得到的样品 (包括流穿、洗涤液和洗脱液) 以及原始样品使用 SDS-PAGE 检测纯化效果。加入适量**蛋白快速染色液**浸没 PAGE 胶，然后置于摇床上摇动，染色 10~30min 即可观测结果。

注：目的蛋白保存前应透析或者超滤以去除游离谷胱甘肽。再分装冻存到 -80℃。

4. 磁珠再生及储存

磁珠再生步骤请参考或直接购买我司 **GST 标签蛋白纯化再生试剂盒**。

磁珠再生后，可以立即使用，如不立即使用需加入等体积 20%乙醇，置于 2~8℃ 保存。

相关产品

货号	产品名称
PK-2001	His 标签蛋白纯化试剂盒 (凝胶法)
PK-2002	GST 标签蛋白纯化试剂盒 (凝胶法)
PK-2003	His 标签蛋白纯化试剂盒
PK-2004	GST 标签蛋白纯化试剂盒
PK-2005	His 标签蛋白纯化再生试剂盒
PK-2006	GST 标签蛋白纯化再生试剂盒
PK-2007	His 标签蛋白纯化试剂盒 (NTA-Ni 凝胶法)

问题解决

问题	原因	解决方案
目的蛋白的产量低或无法检测到	蛋白可能是包涵体，上清无蛋白	可以通过电泳检测裂解液分析上清中是否含有目的蛋白，包涵体蛋白需要按照包涵体蛋白的纯化方式。
	目的蛋白可能失活	采用温和的超声破碎条件或者其他的裂解条件，比如采用溶菌酶。
	目的蛋白被蛋白酶降解	在裂解步骤或洗涤步骤加入适量的蛋白酶抑制剂，如 PMSF。
	目的蛋白不能有效地从磁珠上洗脱下来	延长洗脱时间，或者增加洗脱液中还原性谷胱甘肽的浓度至 15mM 或者更高 在洗脱液中加入 Triton X-100 (终浓度 0.1%)、辛基-葡萄糖苷 (终浓度 2%) 或者 NaCl (终浓度 0.1~0.2 M)。
洗脱液中有较多杂带	目的蛋白被蛋白酶降解	在裂解步骤或洗涤步骤加入适量的蛋白酶抑制剂如 PMSF。
	过度的超声处理会导致一些蛋白与融合蛋白相结合	采用温和的超声破碎条件或者其他的裂解条件。
	有些蛋白会与融合蛋白或磁珠发生非特异性结合	优化洗涤条件：加入一些洗涤剂如 1% Triton X-100、1% Tween-20、0.03% SDS 或者 0.1% NP-40 可以降低非特异性吸附。提高洗涤液中的盐浓度也可以降低非特异性吸附。