

实验试剂及仪器

试剂: GST 琼脂糖凝胶、层析柱、Triton X-100、1*PBS 、Tris-Hcl(pH 8.0) 、EDTA(pH 8.0)、DTT、谷胱甘肽(还原型)、20%乙醇、3*SDS 上样缓冲液、12%分离胶、5%浓缩胶、10%过硫酸铵、TEMED、1*SDS-PAGE 电泳缓冲液、乙醇、乙酸、考马斯亮蓝 (R250)

仪器: 恒流泵、电泳槽、电泳仪、脱色摇床、凝胶成像系统

GST-Tag 纯化

试剂准备:Buffer A(50mM TRIS-HCL pH8.0 5mM DTT)

Buffer B(100mM TRIS-HCL pH8.0 20mM 谷胱甘肽)

- 1、装柱: 往纯化柱中加入约 2 mL 填料(固体体积), 连接恒流泵, 自然沉淀后用 50mL 去离子水洗去乙醇(商品化填料用 20%乙醇保存) 控制流速为 3ml/min, 流出液体。
- 2、用 30mL Buffer A 平衡基质, 控制流速为 3ml/min, 流出液体。
- 3、将破菌离心后的上清(低温 4℃保存) 与基质在 50ml 离心管中混合, 4℃条件下, 在混合培养器上结合 30~60min, 将结合后的液体加入到预装柱中, 控制流速为 3ml/min, 流出液体, 收集流穿液。
- 4、加入 50 mL Buffer A 洗去杂蛋白, 控制流速为 2ml/min, 流出液体, 收集流穿液。
- 5、加入 Buffer B, 用 20ml Buffer B 洗脱目的蛋白, 控制流速为 1.5ml/min, 取 10ml 离心管收集洗脱液 15-20ml。
- 6、加入 15~20 mL Buffer B 洗去基质中残留的蛋白, 然后用 100 mL 纯水清洗纯化柱, 控制流速为 3ml/min, 流出液体。
- 7、用 20%乙醇保存柱子, 于 4℃冰箱中保存。
- 8、SDS-PAGE 电泳确定蛋白浓度。

注意事项:

- 1、在处理基质的所有过程中, 要求液体不能流干, 混合动作温和, 基质中不得有气泡存在。
- 2、上样前, 样品需离心或用滤膜过滤。如果样品太过粘稠, 用 pH8.0 的 PBS 稀释, 以防堵塞柱子。
- 3、样品过渡裂解会引起蛋白变性, 降低结合载量, 采用温和的裂解方法, 增加结合载量。
- 4、GST 融合蛋白与还原型谷胱甘肽的结合比较缓慢, 需要控制上样和洗脱时流速(上样不高于 3mL/min, 洗脱不高于 1.5mL/min), 让其有足够的吸附和分离时间, 以便达到最大的结合载量。蛋白的性质、pH、温度等也会影响蛋白的结合载量。