



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订货热线: 400-1683301或800-8283301
订货e-mail: order@beyotime.com
技术咨询: info@beyotime.com
网址: http://www.beyotime.com

GST标签蛋白纯化试剂盒

产品编号	产品名称	包装
P2262	GST标签蛋白纯化试剂盒	10ml

产品简介:

- 碧云天生产的GST标签蛋白纯化试剂盒(GST-tag Protein Purification Kit), 俗称GST柱试剂盒, 是一种采用了新型的BeyoGold™ GST-tag Purification Resin, 并能简单、快速、高效并且高特异性地纯化GST标签蛋白的试剂盒。
- 试剂盒提供了GST标签蛋白纯化所需的相关试剂和亲和层析柱空柱管, 为GST标签蛋白的纯化带来了极大的便利。
- GST, 即谷胱甘肽-S-转移酶, 与目的蛋白融合表达后, 被称为GST标签重组蛋白、GST标签蛋白或GST融合蛋白。GST标签重组蛋白可以通过GST特异性地结合到BeyoGold™ GST-tag Purification Resin, 而其它蛋白则不能被结合, 含GST标签的重组蛋白可被过量的还原型谷胱甘肽(GSH)溶液洗脱, 从而实现GST标签蛋白的分离和纯化。由于纯化过程始终保持在温和的非变性条件下, 得到的目的蛋白可以保持其自身的生物学活性, 因此可以用于常规的结构和功能研究、抗体制备、以及蛋白与蛋白相互作用、蛋白与核酸相互作用等方面的研究。
- 本试剂盒不仅可以用于大肠杆菌表达的GST标签重组蛋白的纯化, 也可以用于哺乳动物细胞、昆虫细胞及杆状病毒等其它表达系统中表达的GST标签重组蛋白。
- GST标签重组蛋白在大肠杆菌中表达时具有可溶性高, 并且容易保持目的蛋白完整活性等优点。许多真核蛋白在大肠杆菌中是以包涵体的形式表达的, 但当它们在大肠杆菌中与GST融合表达时, 相当一部分可以实现可溶性表达, 从而有利于后续的纯化。
- 如果在GST标签和目的蛋白之间含有位点特异性的蛋白酶识别位点, 如PreScission Protease, TEV Protease或Thrombin等, 则可用相应的蛋白酶切除GST标签。
- 通常在目的蛋白的N端加上GST标签可以保留GST的酶活性, 从而便于使用BeyoGold™ GST-tag Purification Resin进行GST标签重组蛋白的纯化。
- 本试剂盒中的BeyoGold™ GST-tag Purification Resin采用了一种高度交联的6%琼脂糖凝胶(Beyorose™ CL-6B, 与Sephacryl CL-6B性能基本一致)为基质, 并使用了进一步优化的接臂和GSH偶联技术, 可以高容量、高特异性地结合GST标签重组蛋白。和目前市售的大多数同类产品相比, 非特异性蛋白结合更低, 耐受压力更强, GSH的偶联更加稳定。
- BeyoGold™ GST-tag Purification Resin凝胶的颗粒直径为45-165μm。可耐受的最大压力为0.025MPa, 约合5.8psi。采用固定流速进行蛋白纯化时的推荐流速为0.5ml/min。
- BeyoGold™ GST-tag Purification Resin储存在20%乙醇中, 10ml总体积中5ml为凝胶, 5ml为液体。使用时宜把凝胶充分重悬后再吸取。
- BeyoGold™ GST-tag Purification Resin对含GST标签重组蛋白的结合容量大, 其对GST最大结合量为5-6mg蛋白/毫升凝胶, 与国际知名品牌的同类产品结合容量相当。实际使用时的最大结合量取决于待纯化的GST标签重组蛋白的分子量大小, 分子量越大则最大结合容量越大, 分子量越小则最大结合容量越小。对于目的蛋白分子量为50kD的GST标签重组蛋白, 每毫升凝胶的实际最大纯化量约为8-12mg, 对于目的蛋白分子量为100kD的GST标签重组蛋白, 每毫升凝胶的实际最大纯化量约为12-18mg。但对于分子量相同的蛋白, 也会因为蛋白本身特性的不同, 结合的最大容量也会有所不同。
- 一个包装的本产品最多可纯化10种带有GST标签的重组蛋白, 每种蛋白的最大纯化量约为12mg。对于目的蛋白分子量为50kD的GST标签重组蛋白, 一个包装的本产品实际最多可纯化10种约4-6mg蛋白。在不使用亲和层析柱空柱管的情况下, 参考本说明书, 本试剂盒足够进行500次的小量GST标签蛋白纯化。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
P2262-1	BeyoGold™ GST-tag Purification Resin	10ml
P2262-2	裂解缓冲液	180ml
P2262-3	洗脱缓冲液(需添加GSH)	60ml
P2262-4	GSH	184mg
P2262-5	溶菌酶	60mg
P2262-6	亲和层析柱空柱管(3毫升)	10套
—	说明书	1份

保存条件:

4°C保存, 至少一年有效。除BeyoGold™ GST-tag Purification Resin外, 其余均可以-20°C保存。

注意事项:

- 请勿在-20°C或更低温度冷冻保存BeyoGold™ GST-tag Purification Resin。
- BeyoGold™ GST-tag Purification Resin保存和纯化过程中应始终保持凝胶湿润。
- 碧云天有多种不同容量的亲和层析柱空柱管(FCL01/FCL03/FCL06/FCL12/FCL30/FCL60)，可以和本产品配合使用。
- 若离心不能完全除去蛋白样品中的不溶物，可以将样品溶液用0.45μm的滤膜过滤。
- GST标签蛋白的纯化应始终保持在非变性条件下，如果融合蛋白以包涵体形式表达，在使用8M尿素或6M盐酸胍溶解包涵体后，需要通过透析去除尿素和盐酸胍并使蛋白复性后才能使用本产品进行纯化。
- 蛋白样品收集后宜尽快完成纯化工作，并应始终放置在4°C或冰浴，以减缓蛋白降解。为有效抑制蛋白降解，可以在裂解液中添加适量的蛋白酶抑制剂混合物，例如碧云天的P1025/P1026蛋白酶抑制剂混合物(细菌抽提用)，或P1005/P1006蛋白酶抑制剂混合物(通用型)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

如下以最常见的大肠杆菌中表达纯化GST标签蛋白为例，说明本产品的使用方法。在其它体系中表达时，请参考该表达体系的相关使用说明，并借鉴大肠杆菌中纯化GST标签蛋白的使用说明。

1. 大肠杆菌中可溶性GST标签蛋白的诱导表达

如下以最常用的IPTG诱导表达系统给予说明，诱导表达条件的优化请参照所使用的诱导表达体系的详细说明。其它诱导表达系统请参考适当的使用说明进行。

- 挑取表达GST标签蛋白的单克隆，接种到3ml或10-20ml含适当抗生素的LB培养液中，37°C培养过夜。
- 按照1:20的比例取培养过夜的菌液，接种到预热至37°C并含适当抗生素的LB培养液中。例如取5ml培养过夜的菌液接种到100ml预热至37°C并含适当抗生素的LB培养液中。具体的培养体积视需要纯化的蛋白量而定，初步的鉴定培养3-10ml即可；常规的表达纯化，通常可考虑培养100-200ml；制备型的纯化，培养体积可以达到1L或更大。如果希望取得更好的表达效果，建议按照1:100的比例接种过夜培养的菌液，但后续培养至相应的OD值需要更长的时间。
- 37°C常规培养约30-60min或更长时间，至菌液的OD600达到0.6-1.0。
- 加入IPTG至终浓度为1mM，37°C诱导表达2-4小时。
注：可以在加入IPTG前取出少量菌液同样培养2-4小时后作为未诱导的对照，也可以在加入IPTG前直接取出少量菌液作为未诱导的对照。对于特定蛋白的诱导表达，最佳的IPTG浓度、诱导温度、和诱导时间需要通过实验确定。
- 收集菌液至离心管中，4°C 4,000g离心20分钟或4°C 15,000g离心1分钟，弃上清，收集沉淀。随后即可进入细菌裂解步骤，也可以在-20°C或-80°C冻存备用。冷冻保存的菌体使用前需置于冰上解冻15分钟。

2. 10XGSH溶液和洗脱缓冲液的配制

- 10XGSH溶液的配制：把试剂盒提供的184mg GSH用6ml本试剂盒提供的洗脱缓冲液(需添加GSH)溶解并混匀，即为10XGSH溶液。配制好的10XGSH溶液-20°C保存，至少一年有效。
- 洗脱缓冲液的配制：按照9:1的比例混合适量洗脱缓冲液(需添加GSH)和10XGSH溶液，例如9ml洗脱缓冲液(需添加GSH)和1ml 10XGSH溶液混合，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，洗脱缓冲液宜新鲜配制，配制好的洗脱缓冲液4°C保存，两周内有效。洗脱缓冲液的组分为50mM Tris, 150mM NaCl, 10mM GSH, pH8.0。

3. GST标签蛋白的小量纯化

本方法常用于小量样品的快速分析和鉴定，为后续大量制备打下基础。

- 接步骤1(e)，离心收集1ml菌液的细菌沉淀并弃上清，加入100μl裂解缓冲液，将细菌沉淀充分重悬于裂解缓冲液中，可进行轻微的vortex(尽量避免产生气泡)。
注：根据GST标签蛋白表达的丰度，菌液和裂解缓冲液的体积比可以在25:1-5:1范围内适当调整。表达丰度非常高时，每毫升菌液沉淀可以加入200μl裂解缓冲液；表达丰度非常低时，每毫升菌液沉淀可以加入40μl裂解缓冲液。相关溶液的配制方法附后。如有必要，在裂解细菌之前，可以在裂解液中添加适量的蛋白酶抑制剂混合物，例如碧云天的P1025/P1026蛋白酶抑制剂混合物(细菌抽提用)，或P1005/P1006蛋白酶抑制剂混合物(通用型)。
- 加入溶菌酶至1mg/ml并轻轻混匀，尽量避免产生气泡，冰水浴或冰上放置30min。
注：溶菌酶可以用裂解液配制成100mg/ml的母液，临使用前加入。溶菌酶配制成母液后，可以适当分装后-20°C保存。
- 轻轻vortex数下，以充分裂解细菌，尽量避免产生气泡。
- 4°C离心(15000g×10min)，取10μl上清留样作后续检测用，收集余下上清至一新的洁净离心管中。
注：本步骤及后续步骤收集的上清必须保持澄清，即不含任何不溶物。上清中如果混有不溶性杂质会严重影响后续纯化获得蛋白的纯度。
- 加入20μl混合均匀的50% BeyoGold™ GST-tag Purification Resin，4°C在摇床上缓慢摇动30min，以充分结合带GST标签的目的蛋白。
注：缓慢摇动30min已经可以确保蛋白充分结合，但可以根据时间安排的需要缓慢摇动更长时间甚至缓慢摇动过夜。经测试，直接使用50% BeyoGold™ GST-tag Purification Resin也能获得良好的纯化效果。但如果希望获得更高的标签蛋白得率，可以参考步骤4f，用与凝胶等体积的裂解缓冲液平衡BeyoGold™ GST-tag Purification Resin 2-3次。平衡后，待纯化蛋白的得率通常会有所提高。
- 4°C离心(1000g×10s)沉淀凝胶，取20μl上清留样作后续检测用，其余上清弃去。

- g. 加入100 μ l 裂解缓冲液重悬凝胶，4 $^{\circ}$ C离心(1000g \times 10s)，取20 μ l上清留样作后续检测用，其余上清弃去。
- h. 重复步骤g，再进行一次洗涤。
注：如有需要，可以根据具体情况使用PreScission Protease (P2302/P2303)、TEV Protease (P2307/P2308)或Thrombin等酶切融合蛋白的GST标签从而释放目的蛋白。详细的GST标签酶切操作请参考步骤5，GST标签的酶切去除。
- i. 加入20 μ l洗脱缓冲液，轻轻重悬凝胶。4 $^{\circ}$ C离心(1000g \times 10s)，收集上清及凝胶。上清即为纯化获得的带有GST标签的目的蛋白。
- j. 重复步骤i两次。共洗脱并收集约60 μ l纯化的蛋白样品。

4. GST标签蛋白的大量纯化

本方法适用于较大量(例如菌液体积在50ml及以上)蛋白样品的纯化。

- a. 按步骤1(e)，对于新鲜的或解冻的细菌沉淀，按照每克细菌沉淀湿重加入4ml(2-5ml均可)的比例加入裂解缓冲液，充分重悬菌体。如有必要，可以在裂解细菌之前，在裂解液中添加适量的蛋白酶抑制剂混合物，例如碧云天的P1025/P1026蛋白酶抑制剂混合物(细菌抽提用)，或P1005/P1006蛋白酶抑制剂混合物(通用型)。
- b. 加入溶菌酶至终浓度为1mg/ml并混匀，冰水浴或冰上放置30min。
注：溶菌酶可以用裂解液配制100mg/ml的母液，临时用前加入。溶菌酶配制母液后，可以适当分装后-20 $^{\circ}$ C保存。
- c. 冰上超声裂解细菌。超声功率200-300W，每次超声处理10s，每次间隔10s，共超声处理6次。
注：具体超声处理的方式须根据特定型号的超声仪器自行摸索和优化。
- d. (可选做)如果超声处理后裂解液非常粘稠，可以加入RNase A至10 μ g/ml及DNase I至5 μ g/ml，冰上放置10-15min。或者也可以使用适当的装好了较细针头的注射器，反复抽吸数次，以剪切粘稠的基因组DNA等。
- e. 4 $^{\circ}$ C 10,000g离心20-30min，收集细菌裂解液上清并置于冰水浴或冰上。可以取20 μ l上清留作后续检测用。
注：上清必须保持澄清，即不含任何不溶物，才能进行下一步的纯化。上清中如果混有不溶性杂质会严重影响后续纯化获得蛋白的纯度。
- f. 取1ml混合均匀的BeyoGold™ GST-tag Purification Resin，4 $^{\circ}$ C离心(1000g \times 10s)弃去储存液，向凝胶中加入0.5ml裂解缓冲液以重悬并平衡凝胶，4 $^{\circ}$ C离心(1000g \times 10s)弃去液体，再重复平衡1-2次，弃去液体。将约4ml细菌裂解液上清加入其中，4 $^{\circ}$ C在侧摆摇床或水平摇床上缓慢摇动60min。
- g. 将裂解液和BeyoGold™ GST-tag Purification Resin的混合物装入本试剂盒提供的亲和层析柱空柱管(3毫升)中。
注：也可先取1ml混合均匀的50% BeyoGold™ GST-tag Purification Resin装柱，然后用0.5ml裂解缓冲液平衡2-3次后加入约4ml细菌裂解液上清，后续可以把流穿液收集后重复上柱3-5次以充分结合目的蛋白。先混合后装柱的方式操作起来相对麻烦一些，但更有利于GST标签蛋白与填料的充分结合。
- h. 将纯化柱底部的盖子打开，在重力作用下使柱内液体流出，收集约20微升流穿液作后续分析用。
- i. 洗柱5次，每次加入0.5-1ml裂解缓冲液，每次均收集约20微升穿柱的液体用于后续的分析检测用。洗柱及下一步洗脱过程中可以用Bradford法(P0006)简单快速地检测每次洗涤液和洗脱液中的蛋白含量，从而考虑增加或减少洗涤和洗脱的次数。
注：如果出现后续获得蛋白纯度不够高的情况，可以再增加洗柱次数2-3次。若有需要，也可以用PreScission Protease (P2302/P2303)，TEV Protease (P2307/P2308)或Thrombin等酶切融合蛋白的GST标签从而释放目的蛋白。详细的GST标签酶切去除的方法请参考步骤5，GST标签的酶切去除。
- j. 洗脱目的蛋白6-10次，每次用0.5ml洗脱缓冲液。将每次的洗脱液分别收集到不同的离心管中。收集获得的洗脱液即为纯化的GST标签蛋白样品。蛋白纯化效果可以参考图1。

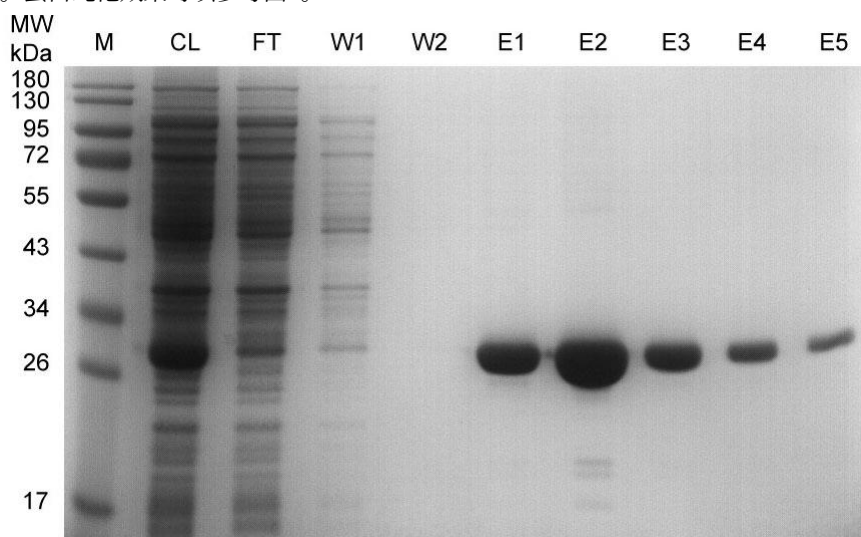


图1. GST标签蛋白纯化效果图。M: marker; CL: 细菌裂解液(cell lysate); FT: 上样流穿液(flow through); W1-W2: 洗涤液1-2 (wash 1-2); E1-E5: 洗脱液1-5 (elution 1-5)。注：实际的电泳结果会因样品、上样量等的不同而有所不同。

5. GST标签的酶切去除

大多数情况下，融合表达的GST标签不会影响目的蛋白的活性，可以用完整的融合蛋白进行活性检测。如果GST标签可能影响目

的蛋白的活性，那么在构建质粒时可以在GST标签和目的蛋白之间加入适当的蛋白酶的识别位点，例如PreScission Protease、TEV Protease或Thrombin等的识别位点，这样就可以在柱上(on column)或洗脱后用相应的蛋白酶切除GST标签。由于PreScission Protease能在4°C进行高效的酶切，而TEV Protease或Thrombin的最佳酶切温度是室温而且耗时较长，因此我们推荐在设计目的蛋白的GST标签时，添加PreScission Protease识别的酶切位点。具体关于如何添加PreScission Protease识别的酶切位点，可以参考PreScission Protease (P2302/P2303)的产品说明书。PreScission Protease (P2302/P2303)可以从碧云天购买。PreScission Protease酶(带有GST标签)切后仅不含GST标签的目的蛋白被洗脱，PreScission Protease、GST标签都会留在凝胶柱上。下面就如何使用PreScission Protease进行GST标签的切除进行详细的说明。

- a. 柱上酶切含GST标签的融合蛋白(以8mg GST标签蛋白/ml凝胶为例)
 - (a) 在GST标签蛋白结合于纯化柱(0.5ml)并用洗涤液充分洗涤后，再用5ml PreScission Protease的酶切缓冲液平衡柱子。PreScission Protease的酶切缓冲液的组分为50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, pH7.5。
 - (b) 准备PreScission Protease: 约每毫克GST标签蛋白使用20U PreScission Protease。对于4mg GST标签蛋白需使用80U PreScission Protease，用PreScission酶切缓冲液稀释至与凝胶柱相同的体积，即0.5ml。
 - (c) 将稀释好的0.5ml PreScission Protease加入纯化柱中，4°C保持4h(为确保酶切完全，可以4°C酶切过夜)。如果蛋白结合是在离心管中进行的，可将准备好的PreScission Protease直接加入离心管中，4°C在摇床上缓慢摇动4小时(为确保酶切完全，可以4°C酶切过夜)。
 - (d) 用0.5ml PreScission Protease酶切缓冲液洗涤，重复三次，分别收集每次的洗涤液。如果酶切反应是在离心管中进行的，1000g离心2分钟，收集上清，然后加入0.5ml酶切缓冲液重新沉淀，离心(1000g×2min)收集上清，接着再加入0.5ml酶切缓冲液重新沉淀，离心(1000g×2min)收集上清。洗脱组分中含有切除了GST标签的目的蛋白，而GST标签和带有GST标签的PreScission Protease则仍然结合在凝胶柱上。
- b. 洗脱后酶切含GST标签的融合蛋白(以8mg GST标签蛋白/ml凝胶为例)
 - (a) 使用脱盐柱快速除去洗脱组分中的GSH，或用PreScission Protease酶切缓冲液进行透析。
 - (b) 按每100μg GST标签蛋白加入2U PreScission Protease的比例加入蛋白酶，如果蛋白未定量，可以按照每0.5ml凝胶加入80U PreScission Protease(按照每毫升凝胶结合8mg GST标签蛋白进行预估)的比例进行。4°C孵育4h。
 - (c) 将酶切后的蛋白样品加入预先用PreScission Protease酶切缓冲液平衡好的BeyoGold™ GST-tag Purification Resin，室温结合20-30分钟。
 - (d) 500g离心5分钟，收集上清，其中含有切除了GST标签的目的蛋白，没有消化的GST标签蛋白和PreScission Protease则结合在凝胶沉淀中。

常见问题：

1. 裂解液中目的蛋白含量过低。

- a. 目的蛋白表达在包涵体中。

需调整表达条件(如降低蛋白表达的温度和使用较低浓度的IPTG进行蛋白的诱导)，使目的蛋白至少部分实现可溶性表达或使用变性剂溶解包涵体后复性，然后再进行纯化。
- b. 培养条件不正确。

在同样的蛋白表达条件下，使用目的蛋白克隆时使用的含GST标签的空载体(例如碧云天的D2916 pET-N-GST-PreScission、D2911 pET-N-GST-Thrombin-C-His、D2926 pT7Duet-N-GST或D2927 pT7Duet-N-GST-PreScission)进行GST表达，观察其表达是否正常。
- c. 诱导表达的蛋白迅速降解。

设置不同的诱导表达时间，摸索细菌培养、蛋白表达和降解的时间，最终选择适当的诱导时间。若蛋白是在细菌裂解后降解，则需加入蛋白酶抑制剂。另外，在蛋白纯化的所有步骤中，须严格保持在4°C左右，以尽量减缓蛋白降解。

2. 表达的GST标签蛋白不与BeyoGold™ GST-tag Purification Resin结合。

- a. 超声导致融合蛋白变性。

超声强度过高会导致融合蛋白变性，从而不能很好地与BeyoGold™ GST-tag Purification Resin结合。此时宜使用温和的超声条件，并且超声过程必须在冰浴中进行。另外也可以考虑采用非超声的裂解条件。
- b. 目的蛋白由于还原性不足，导致空间构象异常。

在裂解前向裂解缓冲液中加入DTT至终浓度1-10mM，这样能显著改善某些蛋白的空间结构，从而有效改善某些GST标签蛋白与GST-tag Purification Resin的结合。
- c. 检测空载体表达的GST与BeyoGold™ GST-tag Purification Resin的结合能力，以确定纯化体系能否正常工作。

表达GST的细菌裂解后，用BeyoGold™ GST-tag Purification Resin纯化其中的GST。如果空载体表达的GST能被BeyoGold™ GST-tag Purification Resin很好地纯化，说明纯化体系是可以正常工作的。融合蛋白可能改变了GST的构象或遮蔽了GST，从而抑制了其与BeyoGold™ GST-tag Purification Resin的结合。可以尝试将蛋白结合温度降低至4°C并减少洗柱的次数来改善，有些蛋白同2b中提到的加入适量的DTT也有可能改善纯化效果。
- d. 使用平衡好的BeyoGold™ GST-tag Purification Resin用于GST标签蛋白的纯化。

GST标签蛋白与BeyoGold™ GST-tag Purification Resin的结合在pH6.5以下或pH8.0以上会显著下降。在将蛋白裂解液与BeyoGold™ GST-tag Purification Resin结合前，请用裂解缓冲液充分平衡。
- e. 使用未使用过的BeyoGold™ GST-tag Purification Resin。

如果BeyoGold™ GST-tag Purification Resin已被多次使用，其与GST标签蛋白的结合能力可能有所下降。在发现GST标签

蛋白不能有效结合的情况下，有必要使用未使用过的BeyoGold™ GST-tag Purification Resin，或将BeyoGold™ GST-tag Purification Resin再生后再尝试使用。

f. 降低蛋白样品上柱时的流速。

影响GST标签蛋白与纯化介质结合的一个非常重要的参数是流速，GST标签蛋白与GSH的结合速度相对较慢，因此在样品上柱时保持较慢的流速对于GST标签蛋白的充分结合非常重要。

3. GST标签蛋白不能被有效洗脱。

a. 使用新鲜配制的洗脱缓冲液。

b. 增加洗脱时间以改善洗脱效果。对于纯化柱的洗脱可以降低洗脱时的流速。

c. 增加洗脱缓冲液的用量。有时，尤其是在柱上通过酶切去除GST标签的情况，需要使用更大量的洗脱缓冲液进行洗脱。

d. 增加洗脱缓冲液中GSH的浓度。

洗脱缓冲液中含有的10mM GSH在大多数情况下是足够进行洗脱的，但也存在洗脱不完全的特殊情况。对于这种情况，可以将洗脱缓冲液中的GSH浓度提高至20-50mM。

e. 提高洗脱缓冲液的pH。

较低的pH会影响洗脱效率。在洗脱效率较低时，可以尝试提高洗脱缓冲液的pH至8-9。

f. 增加洗脱缓冲液中的离子强度。

离子间相互作用可能会将蛋白留在柱上，增加洗脱缓冲液中的离子强度会改善这种状况。通常可以向洗脱缓冲液中加入0.1-0.2M NaCl。

g. 向洗脱缓冲液中加入非离子型去垢剂

非特异的疏水作用可能会使蛋白沉淀，并阻止目的蛋白的洗脱。在此情况下，加入适当的去垢剂可能会有所改善。向洗脱缓冲液中加入Triton X-100至终浓度为0.1%或N-octylglucoside至终浓度为2%，都能够显著改善某些GST标签蛋白的洗脱。

4. 纯化获得的GST标签蛋白经SDS-PAGE电泳/Western blot检测有多条条带。

a. 洗涤条件错误或洗涤不充分。检查纯化过程中是否严格按照说明书的建议进行了充分的的洗涤。

b. 70kD蛋白与GST标签蛋白共纯化

70kD蛋白可能是大肠杆菌*dnaK*基因的表达产物，该蛋白参与大肠杆菌的蛋白折叠过程。据报道它们之间的这种结合可以通过在上柱前，将GST标签蛋白在含有ATP的缓冲液(50mM Tris-HCl, 2mM ATP, 10mM MgSO₄, pH7.4)中37°C孵育10分钟而得以消除。也可以在洗涤时用上述含有ATP的缓冲液洗涤去除，或者后续通过离子交换柱等方法去除70kD蛋白。

c. 加入蛋白酶抑制剂。

多条条带有可能是由于GST标签蛋白的部分降解产生的。向裂解液中加入适当的蛋白酶抑制剂有时会有所改善。

注：在使用Thrombin或factor Xa酶切GST标签蛋白时，溶液中的丝氨酸蛋白酶抑制剂必须除去，否则会严重抑制酶切效果。PreScission Protease通常不被认为是典型的丝氨酸蛋白酶，并且对多种蛋白酶抑制剂不敏感。

d. 使用蛋白酶缺陷型菌株。

多条条带的出现可能是宿主细菌表达的蛋白酶对目的蛋白的酶切结果。如果是这种情况，需要使用蛋白酶缺陷型菌株(如BL21(*ompT*))进行表达。

e. 降低超声强度。

细胞破碎效果可以通过溶液的澄清度或显微镜下观察细菌形态来判断。超声前加入溶菌酶通常可以改善超声破碎效果。尽量注意避免超声过程中产生泡沫，因为这可能会导致GST标签蛋白的变性。过度超声可能会导致宿主蛋白的变性及与GST标签蛋白的共纯化。

f. 采用额外的纯化步骤。

非特异条带可能是与GST标签蛋白与各种分子伴侣的共纯化，因为它们参与大肠杆菌中新合成蛋白的正确折叠。这些蛋白包括但不限于DnaK(70kD)、DnaJ(37kD)、GrpE(40kD)、GroEL(57kD)和GroES(10kD)。这种情况下，可以考虑采用额外的其它方法进一步纯化目的蛋白。

g. 抗GST的抗体中检测GST标签蛋白出现很多杂带时可能识别大肠杆菌的某些蛋白。

所使用的抗GST抗体可能能够与大肠杆菌某些蛋白结合，从而导致Western检测时出现杂带，选择经过大肠杆菌蛋白吸附过的抗GST抗体，就能很好地减少甚至消除这些杂带。

5. GST标签蛋白不能被完全酶切

a. PreScission Protease, TEV Protease或Thrombin等酶的用量不正确。

检查酶切体系中GST标签蛋白的量，从而确定蛋白酶的用量。通常合适的用量为，PreScission Protease至少10U/mg GST标签蛋白，TEV Protease至少300U/mg GST标签蛋白，Thrombin至少10U/mg GST标签蛋白，Factor Xa，酶与GST标签蛋白的比率至少是1%(w/w)。在某些情形下，酶切时使用1mg/ml的GST标签蛋白可以达到比较理想的酶切效果。向反应缓冲液中加入少量SDS(不超过0.5%，w/v)能够显著提高factor Xa对某些GST标签蛋白的酶切效果。

b. 增加酶切时间和提高酶的浓度。

如果GST标签蛋白没有被完全酶切，可以尝试延长酶切时间至20小时或更久。酶量也可酌情增加。

c. 确认蛋白酶特异识别的位点存在。

检查设计构建的DNA序列，并与测序结果相比对，确认所使用酶的特异识别位点是正确的。

d. 确保体系中没有相应蛋白酶的抑制剂。

酶切前，对于在凝胶上的酶切可以用相应的酶切缓冲液平衡，对于在溶液中的酶切可以先用酶切缓冲液充分透析或者脱盐后更换成相应的酶切缓冲液。

6. 酶切后的目的蛋白电泳分析发现多条条带。

a. 确定额外条带是何时出现的。

如果检测确认酶切前这些条带是不存在的，那么这些条带就是酶切后新产生的，这很有可能是GST标签蛋白在宿主细胞中发生降解导致的。如果酶切前这些条带就存在，参考第4点中提到的解决办法。

b. 目的蛋白可能含有PreScission Protease, TEV Protease或Thrombin或factor Xa等的识别位点。此时需要仔细分析基因序列，如果确实存在，就需要考虑重新构建质粒，更换使用不同的蛋白酶。 分析基因序列。

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
P2210	BeyoGold™ His-tag Purification Resin	10ml
P2218	BeyoGold™ His-tag Purification Resin	100ml
P2220	BeyoGold™ His-tag Purification Resin	1000ml
P2226	His标签蛋白纯化试剂盒	10ml
P2250	BeyoGold™ GST-tag Purification Resin	1ml
P2251	BeyoGold™ GST-tag Purification Resin	10ml
P2253	BeyoGold™ GST-tag Purification Resin	100ml
P2255	BeyoGold™ GST-tag Purification Resin	1000ml
P2262	GST标签蛋白纯化试剂盒	10ml
P1005	蛋白酶抑制剂混合物(通用型)	1ml
P1006	蛋白酶抑制剂混合物(通用型)	5ml
P1025	蛋白酶抑制剂混合物(细菌抽提用)	1ml
P1026	蛋白酶抑制剂混合物(细菌抽提用)	5ml
P1030	蛋白酶抑制剂混合物(His-Tag蛋白纯化用)	1ml
P1031	蛋白酶抑制剂混合物(His-Tag蛋白纯化用)	5ml
P2302	PreScission Protease	100U
P2303	PreScission Protease	500U
D2911	pET-N-GST-Thrombin-C-His	1μg
D2916	pET-N-GST-PreScission	1μg
D2931	pET-Dual-N-GST	1μg
D2933	pET-Dual-N-GST-PreScission	1μg
AG768	GST抗体	>20次
AF0174	GST Mouse Monoclonal Antibody	50μl

使用本产品的文献：

- Wei Lv, Wei Jiang, Hongmei Luo, Qian Tong, Xiaoyu Niu, Xiao Liu, Yang Miao, Jingnan Wang, Yiwen Guo, Jianan Li, Xizhen Zhan, Yunqing Hou, Yaxin Peng, Jian Wang, Shuhong Zhao, Zaiyan Xu, Bo Zuo. Long noncoding RNA lncMREF promotes myogenic differentiation and muscle regeneration by interacting with the Smarca5/p300 complex. *Nucleic Acids Res.* 2022 Oct 14;50(18):10733-10755.
- Anming Ding, Xianfeng Tang, Dahai Yang, Meng Wang, Angyan Ren, Zongchang Xu, Ruibo Hu, Gongke Zhou, Malcolm O'Neill, Yingzhen Kong. ERF4 and MYB52 transcription factors play antagonistic roles in regulating homogalacturonan de-methylesterification in Arabidopsis seed coat mucilage. *Plant Cell.* 2021 Apr 17;33(2):381-403.
- Lin Zhao, Xiangying Deng, Yueshuo Li, Jianmin Hu, Longlong Xie, Feng Shi, Min Tang, Ann M Bode, Xin Zhang, Weihua Liao, Ya Cao. Conformational change of adenine nucleotide translocase-1 mediates cisplatin resistance induced by EBV-LMP1. *EMBO Mol Med.* 2021 Dec 7;13(12):e14072.
- Tao Li, Bin Fu, Xin Zhang, Yunjiang Zhou, Mengdi Yang, Mengran Cao, Yaxin Chen, Yingying Tan, Rong Hu. Overproduction of Gastrointestinal 5-HT Promotes Colitis-Associated Colorectal Cancer Progression via Enhancing NLRP3 Inflammasome Activation. *Cancer Immunol Res.* 2021 Sep;9(9):1008-1023.
- Qidong Li, Hanhui Yao, Yichun Wang, Yang Wu, Rick F Thorne, Youming Zhu, Mian Wu, Lianxin Liu. circPRKAA1 activates a Ku80/Ku70/SREBP-1 axis driving de novo fatty acid synthesis in cancer cells. *Cell Rep.* 2022 Nov 22;41(8):111707.
- Wuyi Wang, Jinlai Wei, Hairong Zhang, Xiangru Zheng, He Zhou, Yajun Luo, Jianguo Yang, Qican Deng, Siqi Huang, Zhongxue Fu. PRDX2 promotes the proliferation of colorectal cancer cells by increasing the ubiquitinated degradation of p53. *Cell Death Dis.* 2021 Jun 11;12(6):605.
- Yun-Long Wang, Wan-Wen Zhao, Shao-Mei Bai, Yan Ma, Xin-Ke Yin, Li-Li Feng, Guang-Dong Zeng, Fang Wang, Wei-Xing Feng, Jian Zheng, Ying-Nai Wang, Bing Zeng, Quentin Liu, Mien-Chie Hung, Xiang-Bo Wan. DNA damage-induced paraspeckle formation enhances DNA repair and tumor radioresistance by recruiting ribosomal protein P0. *Cell Death Dis.* 2022 Aug 16;13(8):709.
- Hairong Shi, Hongshun Wang, Cheng Zhang, Yajie Lu, Jun Yao, Zhibin Chen, Guangqian Xing, Qinjun Wei, Xin Cao. Mutations in OSBPL2 cause hearing loss associated with primary cilia defects via sonic hedgehog signaling. *JCI Insight.* 2022 Feb 22;7(4):e149626.
- Yanli Yang, Hui-Guang Li, Jie Wang, Hou-Ling Wang, Fang He, Yanyan Su, Ying Zhang, Cong-Hua Feng, Mengxue Niu, Zhonghai Li, Chao Liu, Weilun Yin, Xinli Xia. ABF3 enhances drought tolerance via

- promoting ABA-induced stomatal closure by directly regulating ADF5 in *Populus euphratica*. *J Exp Bot.* 2020 Dec 31;71(22):7270-7285.
10. Chen Xie, Liu Yang, Guixian Jia, Kang Yan, Shizhong Zhang, Guodong Yang, Changai Wu, Yingping Gai, Chengchao Zheng, Jinguang Huang. Maize HEAT UP-REGULATED GENE 1 plays vital roles in heat stress tolerance. *J Exp Bot.* 2022 Oct 18;73(18):6417-6433.
 11. Xin-Juan Fan, Yun-Long Wang, Wan-Wen Zhao, Shao-Mei Bai, Yan Ma, Xin-Ke Yin, Li-Li Feng, Wei-Xing Feng, Ying-Nai Wang, Quentin Liu, Mien-Chie Hung, Xiang-Bo Wan. NONO phase separation enhances DNA damage repair by accelerating nuclear EGFR-induced DNA-PK activation. *Am J Cancer Res.* 2021 Jun 15;11(6):2838-2852.
 12. Xiao N, Li H, Yu W, Gu C, Fang H, Peng Y, Mao H, Fang Y, Ni W, Yao M. SUMO-specific protease 2 (SEN2) suppresses keratinocyte migration by targeting NDR1 for de-SUMOylation. *FASEB J.* 2019 Jan;33(1):163-174.
 13. Zhou X, Liu Y, Huang J, Liu Q, Sun J, Cai X, Tang P, Liu W, Miao W. High temperatures affect the hypersensitive reaction, disease resistance and gene expression induced by a novel harpin HpaG-Xcm. *SCI REP-UK.* 2019 Jan 30;9(1):990.
 14. Niu J, Huang Y, Li Y, Wang Z, Tang J, Wang B, Lu Y, Cai J, Jian J. Characterization of a tandem-repeat galectin-9 from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) involved in the immune response against bacterial infection. *FISH SHELLFISH IMMUN.* 2019 Sep;92:216-223.
 15. Ni W, Li Y, Cai L, Dong C, Fang H, Chen Y, Li H, Yao M, Xiao N. SUMOylation is required for PIPK1 γ -driven keratinocyte migration and growth. *FEBS J.* 2019 Dec;286(23):4709-4720.
 16. Xiong Y, Yi Y, Wang Y, Yang N, Rudd CE, Liu H. Ubc9 Interacts with and SUMOylates the TCR Adaptor SLP-76 for NFAT Transcription in T Cells. *J Immunol.* 2019 Dec 1;203(11):3023-3036.
 17. Wen Zhang, Shou-Song Tao, Ting Wang, Jie Zhang, Xian Liu, Ya-Ting Li, Hui Chen, Yi-Qun Zhan, Miao Yu, Chang-Hui Ge, Chang-Yan Li, Guang-Ming Ren, Xiao-Ming Yang, Rong-Hua Yin. ABRO1 stabilizes the deubiquitinase BRCC3 through inhibiting its degradation mediated by the E3 ubiquitin ligase WWP2. *FEBS Lett.* 2021 Jan;595(2):169-182.
 18. Ning Zhang, Lingran Zhang, Linjie Li, Junyou Geng, Lei Zhao, Yan Ren, Zhongdong Dong, Feng Chen. Global Profiling of 2-hydroxyisobutyrylome in Common Wheat. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2021 Feb 10;S1672-0229(21)00007-3.
 19. Yueshuo Li, Feng Shi, Jianmin Hu, Longlong Xie, Lin Zhao, Min Tang, Xiangjian Luo, Mao Ye, Hui Zheng, Min Zhou, Na Liu, Ann M Bode, Jia Fan, Jian Zhou, Qiang Gao, Shuangjian Qiu, Weizhong Wu, Xin Zhang, Weihua Liao, Ya Cao. Stabilization of p18 by deubiquitylase CYLD is pivotal for cell cycle progression and viral replication. *NPJ Precis Oncol.* 2021 Mar 2;5(1):14.
 20. Songbiao Chen, Bichen Miao, Nannan Chen, Caiyi Chen, Ting Shao, Xuezi Zhang, Lingling Chang, Xiujuan Zhang, Qian Du, Yong Huang, Dewen Tong. SYNCRIP facilitates porcine parvovirus viral DNA replication through the alternative splicing of NS1 mRNA to promote NS2 mRNA formation. *Vet Res.* 2021 May 25;52(1):73.
 21. Xuehui Zhao, Binbin Wen, Chen Li, Li Liu, Xiude Chen, Dongmei Li, Ling Li, Xiling Fu. PpEBB1 directly binds to the GCC box-like element of auxin biosynthesis related genes. *Plant Sci.* 2021 May;306:110874.
 22. Chao Li, Xue-Jiao Liu, Yan Yan, Mohammad Shah Alam, Zhen Liu, Zhen-Kun Yang, Ruo-Fu Tao, Er-Kui Yue, Ming-Hua Duan, Jian-Hong Xu. OsLHY is involved in regulating flowering through the Hd1- and Ehd1- mediated pathways in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.* 2022 Feb;315:111145.
 23. Yuan Gao, Juan Xiong, Qing-Zhu Chu, Wei-Ke Ji. PDZD8-mediated lipid transfer at contacts between the ER and late endosomes/lysosomes is required for neurite outgrowth. *J Cell Sci.* 2022 Mar 1;135(5):jcs255026.
 24. Yan Hu, Ya-Ping Liang, Hang-Yu Tian, Cui-Xian Xu, Dan Yu, Pan Zhang, Hui Ye, Ming Li. Microplitis bicoloratus bracovirus regulates cyclophilin A-apoptosis-inducing factor interaction to induce cell apoptosis in the insect immunosuppressive process. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2022 May;110(1):e21877.
 25. Guangyong Yang, Jie Yang, Qiwei Zhang, Wenfeng Wang, Liping Feng, Li Zhao, Bang An, Qiannan Wang, Chaozu He, Hongli Luo. The Effector Protein CgNLP1 of *Colletotrichum gloeosporioides* Affects Invasion and Disrupts Nuclear Localization of Necrosis-Induced Transcription Factor HbMYB8-Like to Suppress Plant Defense Signaling. *Front Microbiol.* 2022 Jun 13;13:911479.
 26. Yang Wu, Yichun Wang, Hanhui Yao, Heng Li, Fanzheng Meng, Qidong Li, Xiansheng Lin, Lianxin Liu. MNX1-AS1, a c-Myc induced lncRNA, promotes the Warburg effect by regulating PKM2 nuclear translocation. *J Exp Clin Cancer Res.* 2022 Dec 7;41(1):337.
 27. Qiuchen Li, Zhimin Jiang, Shuning Ren, Hui Guo, Zhimin Song, Saini Chen, Xintao Gao, Fanfeng Meng, Junda Zhu, Litao Liu, Qi Tong, Honglei Sun, Yipeng Sun, Juan Pu, Kin-Chow Chang, Jinhua Liu. SRSF5-Mediated Alternative Splicing of M Gene is Essential for Influenza A Virus Replication: A Host-Directed Target Against Influenza Virus. *Adv Sci (Weinh).* 2022 Dec;9(34):e2203088.
 28. Qianghua Zhou, Xu Chen, Kai Yao, Yangjie Zhang, Haixia He, Hao Huang, Hao Chen, Shengmeng Peng, Ming Huang, Liang Cheng, Qiang Zhang, Ruihui Xie, Kaiwen Li, Tianxin Lin, Hai Huang. TSPAN18 facilitates bone metastasis of prostate cancer by protecting STIM1 from TRIM32-mediated ubiquitination. *J Exp Clin Cancer Res.* 2023 Aug 5;42(1):195.

Version 2023.12.08