

GST标签蛋白纯化试剂盒(琼脂糖磁珠法)

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|--------|----------------------|------|
| P2260S | GST标签蛋白纯化试剂盒(琼脂糖磁珠法) | 10ml |

产品简介:

- 碧云天的GST标签蛋白纯化试剂盒(琼脂糖磁珠法)(GST-Tag Protein Purification Kit with Magnetic Agarose Beads), 即磁珠法GST标签蛋白纯化试剂盒, 是一种采用了高品质BeyoMag™ GST标签蛋白纯化琼脂糖磁珠, 能简单、快速、灵活、高效并且高特异性纯化GST标签蛋白的试剂盒。本试剂盒可以耐受6M盐酸胍或8M尿素。
- 本试剂盒中的GST纯化琼脂糖磁珠, 也称为GST标签蛋白纯化磁珠、GSH琼脂糖磁珠(Magarose)、GST琼脂糖磁珠、谷胱甘肽琼脂糖磁珠, 由高质量的还原型L-谷胱甘肽(L-Glutathione reduced, GSH)共价偶联至琼脂糖磁珠制备而成, 可特异性地与动植物组织裂解液、微生物裂解液、血清、腹水等样品中含有GST标签的蛋白结合, 从而用于带有GST标签的蛋白或蛋白复合物的纯化、免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP)或免疫共沉淀(Co-IP)。
- GST标签(GST-tag)、His标签(His-tag)、Flag标签(Flag-tag)、Myc标签(Myc-tag)和HA标签(HA-tag)等是最常见的一些标签, 通过与这些标签的融合表达可以非常方便地检测目的蛋白及与目的蛋白相互结合的蛋白, 也可以非常方便地用于目的蛋白的纯化。
- GST标签, 即谷胱甘肽S-转移酶(Glutathione S-transferase)标签, GST本身是一个在解毒过程中起到重要作用的转移酶, 分子量约为26kDa, 可融合在蛋白的N端或者C端, 在大肠杆菌中常融合于N端。GST标签具有以下优点: 能增加外源蛋白的可溶性和表达量; 可在不同的宿主如大肠杆菌和酵母中表达, 适用范围广; 可很好保留了蛋白的抗原性和生物活性, 有助于保护重组蛋白免受胞外蛋白酶的降解并提高其稳定性; 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, 方便去除; 高特异性, 纯化方便且温和; GST标签作为标签蛋白, 后续通过GST抗体(AF2888)或Anti-GST磁珠(P2138)、BeyoGold™ GST-tag Purification Resin (P2250)、GST标签蛋白纯化试剂盒(P2262)等即可对目的基因的表达、定位及功能进行检测或对目的蛋白进行纯化、免疫沉淀或免疫共沉淀等。基于以上优点, GST标签已被广泛应用于蛋白表达、纯化、鉴定、相互作用和功能等多方面的研究。一般使用GST纯化柱对GST标签蛋白进行纯化[1,2], 但对于带有GST标签的融合蛋白或蛋白复合物的少量纯化或免疫沉淀等应用, GST标签蛋白纯化琼脂糖磁珠更简单、便捷。
- GST标签蛋白纯化试剂盒(琼脂糖磁珠法)中提供的GST纯化琼脂糖磁珠, 可特异性地结合GST标签融合蛋白, 并可以借助磁力架等磁分离设备以及本试剂盒提供的配套试剂, 从而非常便捷地应用于带有GST标签的融合蛋白或其蛋白复合物的纯化或免疫沉淀等实验。本试剂盒的工作原理与操作流程请参考图1。

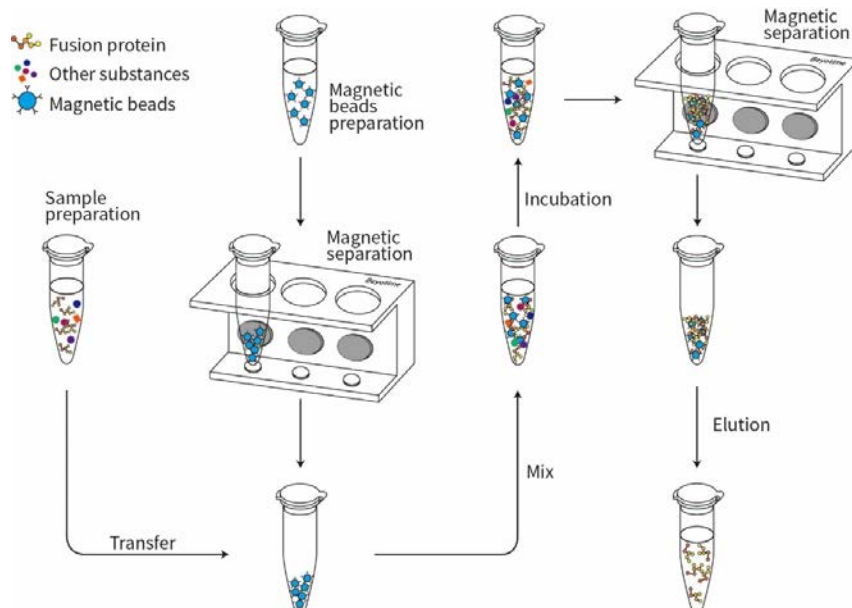


图1. 碧云天GST标签蛋白纯化试剂盒(琼脂糖磁珠法) (P2260)工作原理与操作流程图。

- **本试剂盒使用便捷, 提供了配套试剂。** 本试剂盒提供了GST标签蛋白纯化所需的相关试剂, 为GST标签蛋白的纯化带来了极大的便利。同时磁珠储存在特殊保护液中, 不含甘油, 配合试剂盒提供的缓冲液, 可以通过磁性吸附实现快速高效的分离纯化, 无需离心操作。

- **本试剂盒稳定性高、特异性强、靶蛋白结合量高。**与国内外大多数的同类产品相比，本试剂盒中的GST纯化琼脂糖磁珠表面还原型L-谷胱甘肽(GSH)配基密度高，对带有GST标签蛋白的结合具有很强的特异性。GST纯化琼脂糖磁珠每毫升悬浊液含约25%琼脂糖磁珠沉淀，含有不少于30-50μmol/ml的GSH，通常每毫升磁珠(磁珠沉淀的体积)可结合10-20mg GST标签融合蛋白，具体的最大结合量和标签蛋白的分子量大小等相关。
- **本试剂盒可结合多种形式的GST标签蛋白。**本试剂盒提供的GST纯化琼脂糖磁珠可特异性地结合氨基端(N端)有甲硫氨酸的N端GST融合蛋白(Met-GST-Protein)、N端GST融合蛋白(GST-Protein)、C端GST融合蛋白(Protein-GST)。
- **本试剂盒结合目的蛋白速度快。**本试剂盒使用的GST纯化琼脂糖磁珠，粒径在100μm左右。通常30分钟内即可完成GST蛋白吸附的过程，60分钟内完成目的蛋白纯化或免疫沉淀操作。缩短操作时间可以有效避免在长时间操作过程中目的蛋白的降解或变性，充分保证目的蛋白的活性。
- **本试剂盒可高效洗脱GST标签蛋白。**本试剂盒根据目的蛋白的结构、生物学功能及后续应用的要求等，使用还原型L-谷胱甘肽(GSH)进行多次洗脱。洗脱时间短，洗脱效率高。本试剂盒及同类产品Competitor G用于GST标签融合蛋白的纯化效果参考图2。

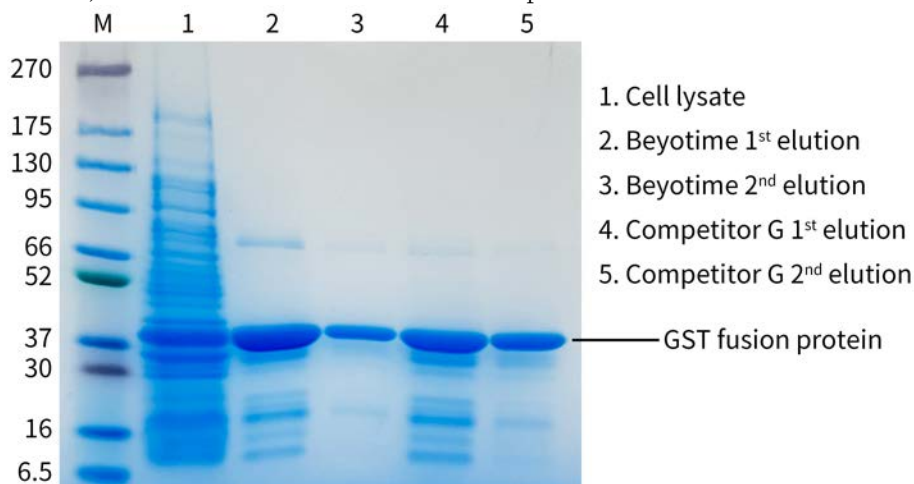


图2. 碧云天GST标签蛋白纯化试剂盒(琼脂糖磁珠法) (P2260)用于GST标签融合蛋白的纯化效果图。样品1为细菌裂解液，即大肠杆菌中GST标签融合蛋白全细菌裂解液；样品2、3分别为GST标签蛋白纯化试剂盒(琼脂糖磁珠法)洗脱第一次、第二次的样品；样品4、5分别为G公司同类产品(Competitor G)洗脱第一次、第二次的样品。实际结果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，本图仅供参考。

- 本试剂盒中GST纯化琼脂糖磁珠的主要指标如下表：

| Characteristics | Description |
|------------------|--|
| Product content | 25% slurry in specific protective buffer |
| Beads size | 30~150μm |
| Magnetization | Superparamagnetic |
| Coupled Ligand | GSH |
| Ligand density | 30-50μmol/ml beads |
| Binding capacity | 10-20mg GST-tagged fusion protein per ml beads (precipitation) |
| Specificity | Met-GST-tag-Protein, GST-tag-Protein, Protein-GST-tag |
| Application | Protein purification, IP, Co-IP |

- 本试剂盒中GST纯化琼脂糖磁珠每毫升悬浊液中共含约0.25ml琼脂糖磁珠沉淀。GST纯化琼脂糖磁珠标注的体积为悬浊液总体积。每毫升悬浊液可以用于纯化2-3mg分子量约为60kDa的GST标签蛋白。GST标签蛋白分子量的大小会影响本试剂盒可以纯化的目的蛋白的毫克数。
- 对于0.5-1克湿重细菌沉淀样品，本试剂盒小包装足够进行10次GST标签重组蛋白纯化。每次蛋白的最大纯化量为2.5-5mg，具体的最大纯化量和蛋白分子量有关；对于分子量为60kDa的带GST标签重组蛋白，每次的蛋白最大纯化量为2-3mg。如果每次使用的样品量较少，本试剂盒可以进行更多次数的GST标签重组蛋白纯化。

包装清单：

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|----------|-------------------------|-------|
| P2260S-1 | BeyoMag™ GST标签蛋白纯化琼脂糖磁珠 | 10ml |
| P2260S-2 | 裂解缓冲液 | 250ml |
| P2260S-3 | 洗脱缓冲液(需添加GSH) | 60ml |
| P2260S-4 | GSH | 184mg |
| P2260S-5 | 溶菌酶 | 60mg |
| — | 说明书 | 1份 |

保存条件：

-20°C保存，两年有效。4°C保存，6个月有效。

注意事项：

- 本试剂盒提供的试剂适用于大多数GST标签蛋白的纯化。对于特殊样品，需自行进行适当的优化。
- 本试剂盒中的GST纯化琼脂糖磁珠经测试，冻融3次不影响效价，但仍建议适当分装减少冻融次数。频繁使用建议4°C保存。
- 本试剂盒中的GST纯化琼脂糖磁珠可以耐受6M盐酸胍或8M尿素，但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6M盐酸胍或8M尿素溶解包涵体后，需要通过透析去除盐酸胍和尿素并使蛋白复性后才能使用本试剂盒进行纯化。
- 本试剂盒中的GST纯化琼脂糖磁珠需维持pH为6-8，避免高速离心、干燥；请勿长时间将磁珠置于磁场中，否则可能会引起磁珠聚团。
- 本试剂盒中的GST纯化琼脂糖磁珠使用前要适当充分重悬，即颠倒若干次使磁珠混合均匀，混匀操作须轻柔，不宜剧烈涡旋震荡。
- 在纯化或免疫沉淀时，建议设置阳性和阴性对照组。
- 洗脱缓冲液(需添加GSH)添加GSH后，含有的GSH易被氧化，建议尽量现配现用。
- 样品及裂解缓冲液中加入1-10mM的DTT，有助于促进部分GST融合蛋白与GST纯化琼脂糖磁珠的结合。
- 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，以减缓蛋白降解或变性。为有效抑制蛋白降解，可以在蛋白样品中添加适量的蛋白酶抑制剂混合物，例如碧云天的蛋白酶抑制剂混合物(通用型, 100X) (P1005/P1006)、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(通用型, 质谱兼容, 50X) (P1048/P1049)、蛋白酶抑制剂混合物(哺乳动物样品抽提用, 100X) (P1010/P1011)、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(哺乳动物样品抽提用, 50X) (P1050/P1051)等。
- 如果使用真空泵等仪器吸取上清液，须注意真空泵的吸液强度，以免吸力过大而吸取到聚集的磁珠。
- 0.1%的非离子型去垢剂(如Triton X-100、Tween-20或NP-40)可有效防止磁珠聚集，并且不会影响磁珠的抗体结合效率。
- 高浓度的DTT、巯基乙醇、盐酸胍等对GST纯化琼脂糖磁珠与标签蛋白的结合可能有一定影响，但Western及IP细胞裂解液(P0013)、RIPA裂解液(P0013B/C/D)或NP-40裂解液(P0013F)等都完全适用。碧云天生产的不同裂解液的主要特点和差异，以及如何选择裂解液可参考我们的相关网页：<http://www.beyotime.com/support/lysis-buffer.htm>。
- 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标签重组蛋白为例，说明本试剂盒的使用方法。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标签重组蛋白的使用说明。

1. 大肠杆菌中GST标签重组蛋白的诱导表达：

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标签重组蛋白的单克隆，接种到3ml或10-20ml含适当抗生素的LB培养液中，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0.5-0.7，并且OD₆₀₀最好接近0.6。
- 加入IPTG至终浓度为1mM，继续培养4-5小时。
注：可以在加入IPTG前取出少量菌液同样培养4-5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 4,000×g离心20min或4°C 15,000×g离心1min，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15min。

2. 10X GSH溶液和洗脱缓冲液的配制：

- 10X GSH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10X GSH溶液。配制好的10X GSH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10X GSH溶液，例如9ml洗脱缓冲液(需添加GSH)和1ml 10X GSH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。

3. BeyoMag™ GST标签蛋白纯化琼脂糖磁珠(GST纯化琼脂糖磁珠)的准备：

- 用移液器轻轻吹打重悬GST纯化琼脂糖磁珠，按照每2-3mg目标蛋白(分子量约为60kDa)需要使用1ml磁珠悬浊液的用量，取适量GST纯化琼脂糖磁珠至一洁净离心管中(FTUB015)，磁性分离去除上清；加入与原磁珠悬浊液等体积或适当更大体积的裂解缓冲液洗涤磁珠。
- 用移液器轻轻吹打重悬GST纯化琼脂糖磁珠。置于磁力架(FMS012/FMS024)上分离10秒，去除上清。重复上述步骤两次。
注：为了减少磁珠的损耗，待溶液澄清后，盖紧离心管盖子，保持离心管仍在磁力架上，按住离心管上下翻转数次，使澄清的溶液洗涤离心管盖子上残留的磁珠，静置后使溶液变澄清。以下同。

c. 根据后续纯化分别选择加入与原磁珠悬浊液等体积的裂解缓冲液重悬琼脂糖磁珠，备用。

4. 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。

a. 按步骤1e，离心收集1ml菌液的细菌沉淀并弃上清，加入100 μ l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200 μ l裂解缓冲液；表达丰度非常低时，每毫升菌液沉淀可以加入40 μ l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, 100X)，或P1005/P1006蛋白酶抑制剂混合物(通用型, 100X)。

b. 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：溶菌酶可以用裂解缓冲液配制成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 $^{\circ}$ C保存。

c. 轻轻vortex数下，以充分裂解细菌，尽量避免产生气泡。

d. 4 $^{\circ}$ C离心(15,000 \times g, 10min)，取10 μ l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。

e. **加入磁珠与孵育。**加入20 μ l步骤3c中混合均匀的GST纯化琼脂糖磁珠悬浊液，置于侧摆摇床或旋转混合仪上，室温孵育20-30min。注：如果需要，可以在2-8 $^{\circ}$ C旋转混合2小时甚至过夜，以防止目标蛋白降解。推荐使用BeyoShakerTM数字式翘板摇床(E6673)或BeyoVortexTM基础型旋转混匀仪(E6800)。

f. **磁分离。**孵育完毕后，置于磁力架上分离10秒，去除上清。注：可保留部分上清液，用于检测目的蛋白的结合效果。

g. **洗涤。**加入100 μ l裂解缓冲液，用移液器轻轻吹打重悬GST纯化琼脂糖磁珠。置于磁力架上分离10秒，取20 μ l上清留样作后续检测用，其余上清弃去。共重复洗涤三次。

h. **洗脱。**加入20 μ l洗脱缓冲液，轻轻翻转离心管数次，使磁珠悬浮孵育5min，磁性分离，收集洗脱缓冲液到新的离心管，即为纯化获得的GST标签蛋白。如果有必要，可以重复洗脱步骤一次，收集样品到新的离心管中，还可以得到一些GST标签蛋白。

5. 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1e，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)裂解液的比例加入裂解液，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, 100X)，或P1005/P1006蛋白酶抑制剂混合物(通用型, 100X)。注：后续试剂用量均按照1克菌重和4ml裂解液用量进行。

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：溶菌酶可以用裂解缓冲液配制成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 $^{\circ}$ 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，可以加入适量核酸酶，如RNase A至10 μ g/ml及DNase I至5 μ g/ml，或BeyoZonaseTM超级核酸酶(\geq 99%) (D7121)，冰上放置10-30min，以降解核酸。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 10,000 \times g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. **加入磁珠与孵育。**加入1ml步骤3c中混合均匀的GST纯化琼脂糖磁珠，置于侧摆摇床或旋转混合仪上，室温孵育20-30分钟。注：如果需要，可以在2-8 $^{\circ}$ C旋转混合2小时甚至过夜，以防止目标蛋白降解。推荐使用BeyoShakerTM数字式翘板摇床(E6673)或BeyoVortexTM基础型旋转混匀仪(E6800)。

g. **磁分离。**孵育完毕后，置于磁力架上分离10秒，去除上清。注：可保留部分上清液，用于检测目的蛋白的结合效果。

h. **洗涤。**洗涤磁珠5次，每次加入0.5-1ml裂解缓冲液，每次均收集约20 μ l穿柱的裂解缓冲液用于后续的分析检测用。洗涤及下一步洗脱过程中可以用Bradford法(P0006或P0006C)简单快速地检测每次裂解缓冲液和洗脱缓冲液中的蛋白含量，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，可以再增加洗涤次数2-3次。

i. **洗脱。**洗脱目的蛋白6-10次，每次用0.5ml洗脱缓冲液洗脱。将每次的洗脱缓冲液分别收集到不同的离心管中。收集获得的洗脱缓冲液即为纯化的GST标签蛋白样品。

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GST纯化琼脂糖磁珠结合。

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GST纯化琼脂糖磁珠结合。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纯化琼脂糖磁珠的结合。

c. 检测空载体表达的GST与GST纯化琼脂糖磁珠的结合能力，以确定纯化体系能否正常工作。

表达GST的细菌裂解后，用GST纯化琼脂糖磁珠纯化其中的GST。如果空载体表达的GST能被GST纯化琼脂糖磁珠很好地纯化，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GST纯化琼脂糖磁珠的结合。可以尝试将蛋白结合温度降低至4°C并减少洗磁珠的次数来改善，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GST纯化琼脂糖磁珠用于GST标签蛋白的纯化。

GST标签蛋白与GST纯化琼脂糖磁珠的结合在pH6.0以下或pH8.0以上会显著下降。在将蛋白裂解液与GST纯化琼脂糖磁珠结合前，请用裂解缓冲液充分平衡。

e. 使用未使用过的GST纯化琼脂糖磁珠。

如果GST纯化琼脂糖磁珠已被多次使用，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GST纯化琼脂糖磁珠，或将GST纯化琼脂糖磁珠再生后再尝试使用。

f. 延长蛋白样品与GST纯化琼脂糖磁珠孵育时间。

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孵育时间，GST标签蛋白与GSH的结合速度相对较慢，因此在样品与磁珠孵育时间保持较长对于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。

c. 增加洗脱缓冲液的用量。

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磁珠上，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GST纯化琼脂糖磁珠前，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前必须除去，否则会严重抑制酶切效果。Precission 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。

| Problem | Possible Causes | Solution |
|--|--|--|
| Very few or no GST-tagged protein exists in the eluate. | Protein is not completely eluted. | 1. Increase the GSH concentration to 15mM or higher in the elution buffer. 2. Increase the elution or incubation time. 3. Add Triton X-100 (0.1%) or n-Octylglucoside (2%) or NaCl (0.1-0.2M) to the Elution Buffer. |
| | No target protein expressed. | Make sure the protein of interest contains the GST-tag by Western blot or dot blot analyses. |
| | Very low protein expression level. | 1. Use larger volume of cell lysate. 2. Optimize expression conditions to raise the protein expression level. |
| | Washes are too stringent. | Reduce the time and number of washes. |
| | Incubation times are inadequate. | Increase the incubation time. |
| | Detection system is inadequate. | If Western blot detection is used: 1. Check primary and secondary antibodies using proper controls to confirm binding and reactivity. 2. Verify that the transfer was adequate by using pre-stained protein marker or staining the membrane with Ponceau S. 3. Use fresh detection substrate or try a different detection system. |
| The purity of the target protein is low. | The target protein has degraded. | Add appropriate protease inhibitors such as PMSF to the cell lysate and Binding/Wash Buffer. |
| | Host proteins, such as chaperonins, may interact with the fusion protein | 1. Add DTT (5mM) in the Binding/Wash Buffer. 2. Add Chaperonin Buffer (2mM ATP, 10mM MgSO ₄ , 50mM Tris-HCl) to the cell lysate and incubate at 37°C for 10 minutes prior to the purification. |
| | Washes are insufficient. | 1. Increase the number of washes. 2. Prolong duration of the washes, incubating each wash for at least 15 minutes. 3. Add more stringent wash conditions. Detergent such as 1% Triton X-100, 1% Tween-20, 0.03% SDS, or 0.1% NP-40 may be used. 4. Centrifuge at lower speed to avoid nonspecific trapping of denatured proteins. |
| The binding capacity of the magnetic beads has declined. | Protein or other substances have aggregated on the beads. | Wash the beads with NaOH. |
| | The beads have been reused too many times. | Use new beads. |

参考文献：

1. Einarson MB, Pugacheva EN, Orlinick JR. CSH Protoc. 2007. 2007:pdb.prot4757.
2. Schäfer F, Seip N, Maertens B, Block H, Kubicek J. Methods Enzymol. 2015. 559:127-39.

相关产品：

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|------|------|----|
|------|------|----|

| | | |
|-------------|---|--------|
| P2138-0.5ml | BeyoMag™ Anti-GST Magnetic Beads (Anti-GST磁珠) | 0.5ml |
| P2138-2ml | BeyoMag™ Anti-GST Magnetic Beads (Anti-GST磁珠) | 2ml |
| 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 |
| P2258-2ml | BeyoMag™ GST标签蛋白纯化琼脂糖磁珠 | 2ml |
| P2258-10ml | BeyoMag™ GST标签蛋白纯化琼脂糖磁珠 | 10ml |
| P2258-50ml | BeyoMag™ GST标签蛋白纯化琼脂糖磁珠 | 50ml |
| P2260S | GST标签蛋白纯化试剂盒(琼脂糖磁珠法) | 10ml |
| P2262 | GST标签蛋白纯化试剂盒 | 10ml |
| FMS004 | BeyoMag™磁分离架(4孔, 1.5ml/2ml, 蓝) | 1个/盒 |
| FMS008 | BeyoMag™磁分离架(8孔, 1.5ml/2ml, 蓝) | 1个/盒 |
| FMS009 | BeyoMag™磁分离架(8孔, 1.5ml/2ml, 铝合金) | 1个/盒 |
| FMS012 | BeyoMag™磁分离架(12孔) | 1个/袋 |
| FMS015 | BeyoMag™磁分离架(16孔, 1.5ml/2ml, 铝合金) | 1个/盒 |
| FMS016 | BeyoMag™磁分离架(16孔, 1.5ml/2ml, 蓝) | 1个/盒 |
| FMS017 | BeyoMag™磁分离架(16孔, 0.2ml/PCR管, 蓝) | 1个/盒 |
| FMS024 | BeyoMag™磁分离架(24孔) | 1个/袋 |
| FMS025 | BeyoMag™磁分离架(24孔, 1.5ml/2ml, 铝合金) | 1个/盒 |
| FMS081 | BeyoMag™磁分离架(96孔, PCR板, 蓝) | 1个/盒 |
| FMS082 | BeyoMag™磁分离架(96孔, PCR板, 铝合金) | 1个/盒 |
| FMS085 | BeyoMag™磁分离架(96孔, 平底板, 蓝) | 1个/盒 |
| FMS086 | BeyoMag™磁分离架(96孔, 细胞培养板, 铝合金) | 1个/盒 |
| FMS096 | BeyoMag™磁分离架(96孔) | 1个/袋 |
| FMS154 | BeyoMag™磁分离架(4孔, 15ml, 蓝) | 1个/盒 |
| FMS504 | BeyoMag™磁分离架(4孔, 50ml, 蓝) | 1个/盒 |

Version 2023.09.23