

用 AKTExpress 色谱系统 GSTrap 4B 柱和 HiLoad 16/60 Superdex 200 pg 柱进行两步法全自动纯化 GST-hippocalcin

J. Lundqvist and A. Karlsson
GE Healthcare, Uppsala, Sweden

用 AKTExpress™ 智能蛋白质多维纯化系统进行两步、全自动纯化，从 *E. Coli* 裂解液中纯化 GST- 标记的 hippocalcin (海马钙结合蛋白)。两步法的第一步是亲和层析捕获，该步主要使用 1 ml GSTrap™ 4B 柱，第二步是凝胶过滤，该步主要使用 HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 pg 柱。使用两步纯化法可以获得高纯度的 GST-hippocalcin，并显示出 GST-hippocalcin 目标蛋白质的二聚体和一个大的多聚体。

引言

谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST) 是继组氨酸之后的第二个应用最多的重组蛋白标记。GST 基因融合系统利用质粒 pGEX 在 *E. coli* 中进行可诱导、高水平细胞内表达基因或与日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum*) GST 融合的基因片段 (1)。通过用谷胱甘肽琼脂糖的层析柱捕获，然后用还原型谷胱甘肽洗脱可以很方便地纯化出标记蛋白质。

GSTrap 4B 柱是一些新型 1-ml 和 5-ml HiTrap™ 柱，便于纯化 GST- 标记蛋白和谷胱甘肽结合蛋白。这类柱子用谷胱甘肽琼脂糖 4B 预包装，以增加其对 GST- 标记蛋白的结合力。用 GSTrap 4B 柱纯化 GST- 标记蛋白仅用注射器、泵、或 AKTAdesign™ 和 FPLC™ 系统等色谱系统即可进行。此外，这类柱子的设计旨在易于扩展纯化以及用一步和两步法纯化 GST- 标记蛋白。

本文介绍两步法全自动纯化谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST) 标记的海马钙结合蛋白 (hippocalcin)。第一步是亲和层析捕获，采用一个 1-ml GSTrap 4B 柱；第二步是凝胶过滤精纯 (gel filtration polishing step)，采用 HiLoad 16/60 Superdex 200 pg 柱。应用 AKTExpress 系统进行纯化，该系统是一种专门用于全自动、多维纯化蛋白质的智能型色谱系统。

方法

先用酶裂解含有 GST-hippocalcin 的 *E. coli* BL21 细胞，然后再用超声裂解。裂解液在 20 °C 离心，然后通过 0.45 μm 的过滤器过滤。待样品澄清后把 5 ml 澄清的裂解液上样到一个 1-ml GSTrap 4B 柱上，进行第一步亲和层析捕获。用 HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 pg 柱进行第二步凝胶过滤精纯 (polishing)。两步法的模板用 UNICORN™ 软件创建。

AKTExpress 系统能够全自动地把来自第一步捕获 (GSTrap 4B 柱) 的洗脱混合的目标蛋白组分加载到 HiLoad 16/60 Superdex 200 pg 凝胶过滤柱上。

用于 1-ml GSTrap 4B 柱上亲和色谱捕获 (AC) 的样品、结合及洗脱缓冲液和用于凝胶过滤一步法的缓冲液的细节如图 1 所示。所有的缓冲液在使用之前都要脱气。

用 ExcelGel™ SDS Gradient 8-18 凝胶在 Multiphor™ II 电泳系统上，通过 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测目标蛋白质的纯度。

结果

图 1 显示了全自动两步法纯化的色谱图和目标蛋白洗脱池的 SDS-PAGE。凝胶过滤后得到了两个峰，一个峰较高，一个峰较低，SDS-PAGE 显示出这两个峰都包括 GST-hippocalcin (高峰：图 2，4 道；低峰：数据未显示)。根据对凝胶过滤 (GF) 一步法的评估，高峰似乎是 GST-hippocalcin 二聚体。低峰是 GST-hippocalcin 多聚体，如图 2，4 道所示，所得 GST-hippocalcin 纯度较高。

结论

采用两步纯化法可以提高 GST-hippocalcin 的纯度。本文所述全自动 AC-GF 两步纯化法可获得高纯度的蛋白，同时能提供 GST 标记目标蛋白的多聚体信息，而单独使用一步法不可能做到这一点。

参考文献

1. GST Gene Fusion System Handbook, Amersham Biosciences, 18-1157-58 (2002).

有关 GSTrap 4B 柱的更多信息，请登录：

www.gehealthcare.com/hitrap 下载 Data File 28-4048-14

订购信息

产品	货号
GSTrap 4B (5 × 1 ml columns)	28-4017-45
HiLoad 16/60 Superdex 200 pg (1 column)	17-1069-01
AKTExpress, four module system	18-6645-04
<i>E. coli</i> BL21 (1 vial)	27-1542-01
ExcelGel SDS Gradient 8-18 (6 precast gels)	80-1255-53
Multiphor II electrophoresis system	18-1018-06
LMW-SDS Marker Kit (10 vials, 575 μg/vial)	17-0446-01

色谱柱:	GSTrap 4B, 1 ml HiLoad 16/60 Superdex 200 pg, 120 ml
样品:	Clarified <i>E. coli</i> lysate containing expressed GST-hippocalcin, M_r 45 000
样品体积:	5 ml (GSTrap 4B)
结合缓冲液 (GSTrap 4B):	10 mM sodium phosphate, 140 mM NaCl, 20 mM DTT, pH 7.4
洗脱缓冲液 (GSTrap 4B):	50 mM Tris-HCl, 20 mM glutathione, 20 mM DTT, pH 8.0
缓冲液 (HiLoad Superdex):	10 mM sodium phosphate, 140 mM NaCl, 20 mM DTT, pH 7.4
Flow rate:	上样, 0.3 ml/min (GSTrap 4B) 洗脱, 1 ml/min (GSTrap 4B), 1.5 ml/min (HiLoad 16/60 Superdex 200 pg)
运行温度:	22 °C
色谱系统:	ÄKTExpress

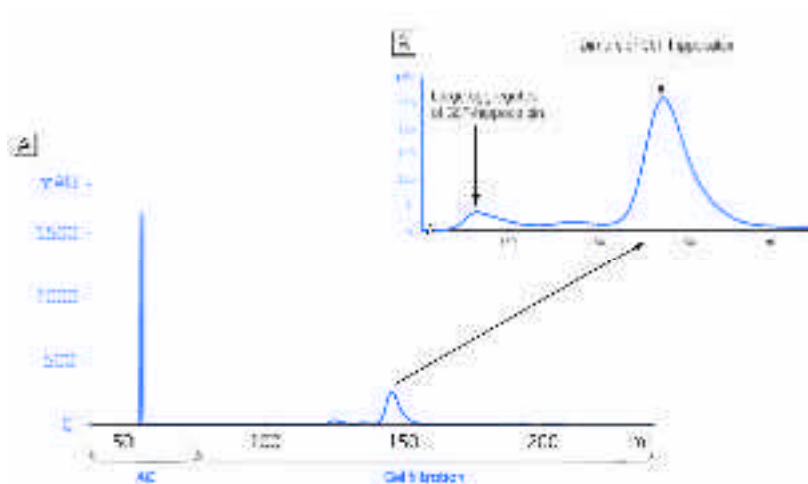
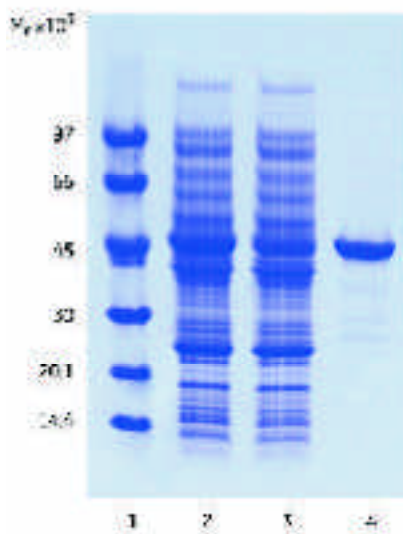


图 1. (A) 用 ÄKTExpress 通过全自动两步纯化法从 *E. coli* 裂解液中纯化 GST-hippocalcin。 (B) 放大凝胶过滤得到的峰显示纯化的 GST-hippocalcin 两个峰为多聚体和二聚体。



泳道

1. LMW markers
2. 起始物质, 稀释 1:10
3. GSTrap 4B 亲和层析流出液, 稀释 1:10
4. 来自凝胶过滤、未经稀释的 GST-hippocalcin 洗脱峰

图 2. SDS-PAGE (ExcelGel™ SDS Gradient 8-18) 显示 GST-hippocalcin 的最终纯度 (第 4 泳道)。