

用 GST MultiTrap FF 96 孔滤板筛选纯化 GST 标记蛋白的最佳缓冲液

GST MultiTrap™ FF 是一种预先包被好的 96 孔滤板，用于可重复、高通量筛选与快速纯化谷胱甘肽-S 转移酶 (GST) 标记蛋白质。本文描述了用新型 GST MultiTrap FF 96 孔滤板筛选从未澄清的大肠杆菌 BL21 裂解液中纯化 GST-hippocalcin (海马钙蛋白) 所需最佳结合缓冲液的实验方法。

方法

用 MODDE 软件 (Umetrics) 设计筛选缓冲液研究方案，以确定从未澄清的大肠杆菌 BL21 裂解液中纯化 GST-hippocalcin 所需的最佳结合缓冲液。多种随机试验的缓冲物质变化范围：10-20 mM 磷酸钠；50-100 mM Tris-HCl；pH 6.2-8.0；140-400 mM NaCl；0-5 mM DTT；0-5% 甘油和 0-2 mM 谷胱甘肽。同时，对超声和市场上细胞裂解试剂盒 CellLytic™ Express (Sigma-Aldrich) 裂解大肠杆菌的效果也进行了比较。表 1 详细总结了所用缓冲液及裂解方法。32 种不同的结合缓冲液随机加到滤板上，每种结合缓冲液做三个平行样。先将 GST-hippocalcin 结合到滤板孔内，然后洗涤两次，最后用 50 mM Tris-HCl，pH 8，10 mM 还原型谷胱甘肽洗脱进行蛋白纯化。

结果

样品和结合缓冲液中还原型谷胱甘肽能显著降低纯化 GST-hippocalcin 的产量 (表 1，图 1 泳道 5, 7, 10)。pH 值降低 (pH 6.2) 时，可见纯化 GST-hippocalcin 的产量提高。实验发现，不同缓冲液和添加剂 (如 DTT，甘油，氯化钠) 对纯化结果影响不显著。

10-20 mM 磷酸钠，140-400 mM 氯化钠，pH 6.2-7.4 的结合缓冲液纯化效果最佳，得到 GST-hippocalcin 的产量与纯度最高 (表 1)。此外，超声或细胞裂解试剂盒都可用于裂解大肠杆菌，两种方法对纯化结果无明显差异。SDS-PAGE 图谱显示，用 GST MultiTrap FF 纯化 GST-

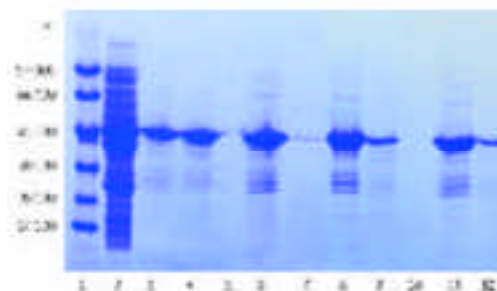
hippocalcin 时，不同的缓冲液条件对纯化 GST-hippocalcin 的纯度没有显著影响。表 1 列出的不同缓冲液对 GST-hippocalcin 的纯化产量的影响得到 SDS-PAGE 图谱 (图 1) 的证实。

结论

研究结果表明，使用一种最佳的结合缓冲液对纯化 GST 标记蛋白很重要。GST MultiTrap FF 96 孔滤板为确定最佳缓冲液条件提供了一个简便、快速的筛选工具。

有关 GST MultiTrap 96 孔滤板的更多信息，请访问 www.gehealthcare.com/protein-purification，
下载文件 28-4081-57

96 孔滤板： GST MultiTrap FF
样品： 含有 GST-海马钙蛋白 (分子量 45,000) 的未澄清大肠杆菌 BL21 裂解液
纯化程序： 执行 GST MultiTrap 说明书，28-4070-75
样品制备： 比较 CellLytic Express 试剂盒和超声裂解法。两种方法均按照标准规程进行操作
样品体积： 500 µl
洗脱体积： 3 × 200 µl
结合缓冲液： 多种缓冲物质随机试验：10-20 mM 磷酸钠；50-100 mM Tris-HCl；pH 6.2-8.0；140-400 mM NaCl；0-5 mM DTT；0-5% 甘油，和 0-2 mM 谷胱甘肽
洗脱缓冲液： 50 mM Tris-HCl，10 mM 还原型谷胱甘肽，pH 8.0
洗脱方法： 离心
数据评估： MODDE 软件，紫外分光光度计 (A₂₈₀)，SDS-PAGE



第 1 道：低分子量 Marker；第 2 道：初始样品；
第 3-12 道：说明见表 1。

图 1. 用 SDS-PAGE (还原条件，浓度 8-18% 的 ExcelGel™ SDS 梯度胶；Coomassie™ 染色) 对从 GST MultiTrap FF 滤板孔中洗脱的 GST hippocalcin 收集组分进行分析。其它关于产量和纯度的细节见表 1。

表 1. 应用不同结合缓冲液 (包括样品液和洗液) 在 GST MultiTrap FF 96 孔板上纯化 GST-hippocalcin 进行筛选实验的部分结果

结合缓冲液	裂解方法	产量 (µg)	纯度 (%)	SDS-PAGE 图谱泳道 (图 1)
10 mM PBS, 140 mM NaCl, pH 7.4	超声	181	95	3
10 mM PBS, 140 mM NaCl, pH 7.4	CellLytic Express	191	94	4
10 mM PBS, 400 mM NaCl, 2 mM 谷胱甘肽, 5% 甘油, pH 8	CellLytic Express	10	95	5
20 mM PBS, 400 mM NaCl, 5% 甘油, pH 6.2	超声	328	87	6
20 mM PBS, 400 mM NaCl, 2 mM 谷胱甘肽, pH 8	超声	18	92	7
50 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 5% 甘油, pH 6.2	超声	269	87	8
50 mM Tris-HCl, pH 8	超声	54	83	9
50 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 2 mM 谷胱甘肽, 5 mM DTT, 5% 甘油, pH 8	超声	-	-	10
100 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 5 mM DTT, pH 6.2	超声	243	77	11