

# 应用 GSTrap FF 高效快速地纯化和在层析柱上原位酶切 GST 融合蛋白

## 摘要

在很多实验室中一步得到可溶的纯化蛋白的纯化策略是非常有用和必要的。这篇应用文献描述了用 GSTrap™ 层析柱和 PreScission 蛋白酶来纯化 GST 融合蛋白的一种灵活、快速、有效的蛋白纯化方案。用该方法纯化后的蛋白质可分别用于蛋白质的功能、结构和化学性质的研究。该方法只经过一次层析柱就可以得到“天然”蛋白质（去除了融合标签的蛋白质），并且回收率高，纯度可达 95%~97%。

## 前言

本文描述的纯化方法对于现在的大多数实验室都是非常有价值的。该方法的技术原理涉及到 pGEX-6x 载体，表达的带有 PreScission 蛋白酶酶切位点的 GST 融合蛋白与 GSTrap-FF 亲和层析柱的结合，同时还有 PreScission 蛋白酶。这样表达和纯化出来的目标蛋白质的回收率高，浓缩倍数大，避免了以往常用的复杂的多步纯化方法而导致的目标蛋白质的回收率低的现象。目标蛋白质经过克隆、表达和纯化以及柱上原位酶切后就得到了高纯度的目的产物。这种纯化策略的目的是拿到高纯度的“天然”蛋白质样品以用于下一步的生化分析和结构学研究，特别是做蛋白质晶体衍射分析。

## 一种灵活的适用于不同基因工程产品的纯化方法

为了检验该纯化方案的实用性和有效性，我们选择了两种毫不相干的蛋白质即 Pur-a 和 TPL-40 为例。

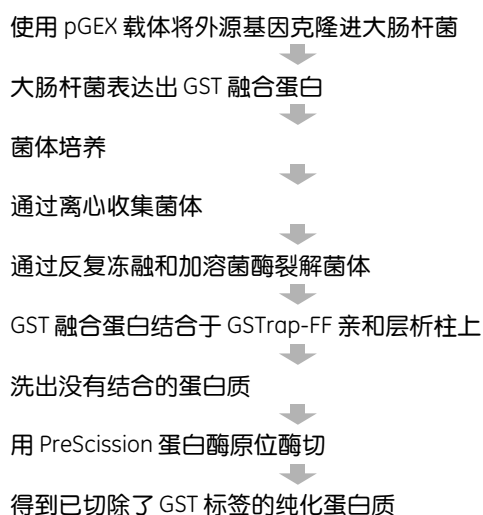


图 1 GST 融合蛋白纯化和柱上酶切的一般程序

## 菌体培养，蛋白质过表达和菌体收获

Pur- $\alpha$  和 TLP40 基因被克隆到 pGEX-6P-1 载体中然后转入到大肠杆菌 BL21。在 LB 培养基中加入 100ug/ml 的羧苄青霉素，+30 °C TUNAIR 摇瓶培养。至菌体生长至 OD<sub>600</sub> = 1.0 时加入 1.0mM IPTG(终浓度)诱导 GST 融合蛋白表达，继续培养 3-4h。离心 (3000g,+4 °C,30min) 收集菌体，沉淀用 TB 缓冲液 (9.1mM HEPES, 55 mM MgCl<sub>2</sub>,15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl 校正 pH 值至 6.7) 重悬和洗涤，离心后放 -80 °C 存放。

## 菌体裂解

含有 GST 融合蛋白的菌体用 PBS 裂解缓冲液(140 mM NaCl,2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 校正 pH 值至 7.4)重新悬浮，补充溶菌酶(1 mg/ml, Sigma), Complete™ 蛋白酶抑制剂(1 片, Roche),10 mM MgCl<sub>2</sub> 和 DNA 酶 I (10 U/ml, Roche)。菌体通过三次反复冻融 (-170 °C/+30 °C) 被有效裂解，然后 70000g ,+4 °C 离心 30min。上清用 300000g ,+4 °C 超速离心 60min 以去除不溶的蛋白，细胞碎片和膜成分。上清加到 50 ml Superloop™ 中以方便进一步上样到 GSTrap FF 层析柱上。

## GST 融合蛋白与填料的结合

下面描述的纯化过程是在 ÄKTA™ explorer 100 层析系统上来完成的。包含在上清中的 GST 融合蛋白通过 Superloop™ 被加载到用 pH 7.4 的 PBS 平衡好的两根串联起来的 GSTrap FF 5 ml 层析柱上。上样时流速降至 1ml/min 以提高融合蛋白与亲和介质 (Glutathione Sepharose™ 4 Fast Flow) 之间的结合力，用 pH 7.4 的 PBS 冲洗结合有 GST 融合蛋白的层析柱至基线平稳。基线平稳后将缓冲液换为适合于 PreScission 蛋白酶的缓冲液(50 mM Tris HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 8.0)。

因为 PreScission 缓冲液中含有使 PreScission 蛋白酶起作用的成分，所以用 PreScission 缓冲液冲洗结合有 GST 融合蛋白的 GSTrap FF 层析柱时一定要等到紫外吸收和电导的基线都平稳时才能停止。

## 用 PreScission 蛋白酶在层析柱上原位切除 GST 融合蛋白

当 GST 融合蛋白已经有效的结合在 GSTrap FF 层析柱上，并且也已经用 PreScission 缓冲液冲洗好了时，酶切反应就可以开始了。利用结合在 GSTrap FF 层析柱上

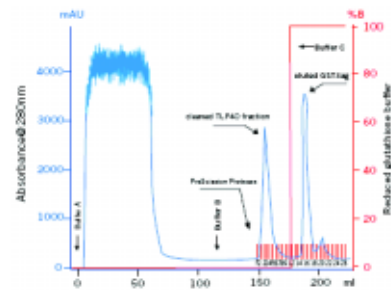
的 PreScission 蛋白酶的性质, 就能完成一次简单快速的切除反应。这个反应在 +4°C 时效率最高, 并且具有特异性和可再生性。PreScission 蛋白酶也带有一个不可切除的 GST 标签, 因此适合于柱子上的在位切除, 并且使它保留在层析柱上, 通过层析系统来监测任何从层析柱上流出的物料。

要水解 100ug 的 GST 融合蛋白需要 2 单位的酶。可以根据层析柱的体积来计算需要稀释的 PreScission 蛋白酶的缓冲液的量 (例如: 对于 5ml 的层析柱需要 4.5ml), 用手工的注射方法将蛋白酶液注入层析柱, 注射时的流速可增加至 5-7 ml/min, 增加流速的目的是减少 PreScission 蛋白酶与 GSTrap FF 层析柱之间的亲和作用, 使 PreScission 蛋白酶均匀地分布于整个层析柱中。PreScission 蛋白酶注入层析柱后, 关闭系统流速, +4°C 在线孵浴 12~16h。

### 洗脱酶切后的纯化蛋白质

在开始洗脱之前, 先将一个 1ml 的 GSTrap FF 层析柱 (事先用 PreScission 缓冲液平衡好的) 连接在进行了在位酶切的 GSTrap FF 层析柱的下端。这样做的作用之一是开始洗脱后在酶切下来的蛋白到达管道之前有一个体积延迟, 在样品峰出来之前能有一小段基线, 尽量减少酶解后样品的损失; 同时 GSTrap FF 层析小柱还有一个过滤的作用, 可以吸附脱落下来的酶解开的 GST 蛋白、没有酶解的 GST 融合蛋白和没有结合的 PreScission 蛋白酶。

酶切后的蛋白质被流过的 PreScission 缓冲液冲洗下来, 切除了标签的蛋白首先经过 1ml 的 GSTrap 层析柱, 然后到达监测器和组分收集器。目标蛋白峰的外形不太对称是由于在孵育过程中酶切后的蛋白的扩散以及有些没有结合的蛋白质造成的。目标蛋白被洗脱完毕紫外吸收值回到基线后, 就可以利用 GST 亲和拮抗物 (还原型谷胱甘肽) 来洗脱 GST、没有酶切的 GST 融合蛋白和 PreScission 蛋白酶。用含有还原型谷胱甘肽的



GSTrap × 25ml 在 AKTA explorer 100 系统上:  
 样品: TLP40 (2Lde 培养液中抽出 50ml 上样)  
 缓冲液 A: PBS, PH 7.4  
 缓冲液 B: PreScission 缓冲液, PH 8.0  
 缓冲液 C: 还原的谷胱甘肽缓冲液, PH 8.0

图 2. 用 GSTrap 和 PreScission 蛋白酶纯化和在柱上酶切 GST-TLP40 融合蛋白

缓冲液 (50 mM Tris-HCl 和 10 mM 还原型谷胱甘肽, pH 8.0) 一步梯度 (100%) 洗出 GST 亲和峰。整个纯化过程和柱上酶切的层析图谱见图 2。

### 纯化后的目标蛋白的检定

通过 SDS-PAGE 分析不同纯化阶段和层析过程中目标蛋白质的纯度。

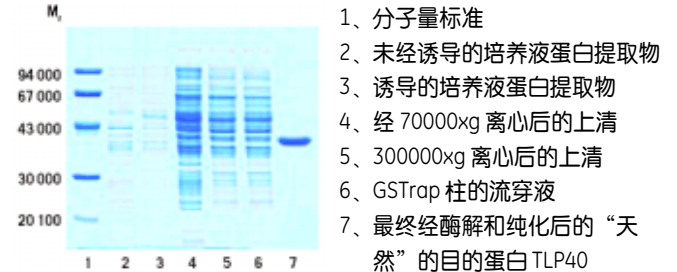


图 3. 用 SDS-PAGE 浓度 3.5-12% 的胶对样品纯化过程的蛋白纯度进行分析, 用考马斯亮蓝染色

图 3, 可以看到酶切后的目标蛋白被高度富集并且含有很少的杂质。经过一次层析柱的纯化目标蛋白的纯度估计有 95~97%。

### 结论

本文描述的分离纯化可溶的“天然”蛋白质的方法操作简单、速度快。通过 GSTrap 亲和层析柱和 PreScission 蛋白酶使 GST 融合蛋白吸附并在层析柱上原位酶切操作非常容易, 蛋白质回收率高并且纯度达到下一步试验的要求。这种纯化策略体现了 pGEX-6P-1 表达系统的优点, 与之对应的是精心设计的 PreScission 蛋白酶的高度特异性以及它带有的不可酶解的 GST 标签使它能够结合于 GSTrap 层析柱上。由于背景低、没有蛋白酶污染以及结果易重复, 这种方法可以成为蛋白表达和纯化实验的标准。纯化方法的改进促使对蛋白纯度判定标准的提高, 那就是纯化后的蛋白质是否可用于结晶。用以上方法纯化出的蛋白质可以形成结晶, 表明纯度已经很高并且结构均一。

由于这种纯化方法简单、快速和极高的回收率, 使它成为纯化“天然”蛋白质方法的首选。

详细资料请参阅  
 Appliation notes 18-1146-70