

アフィニティゲル担体 Q&A

GST融合タンパク質精製

質問	回答
Q. 低濃度の試料から精製したい	<ul style="list-style-type: none">・精製の前に、サンプルを濃縮して下さい。・ゲルと試料との結合反応をバッチ法で行い、結合反応後のゲルをカラムに充填して、精製を行って下さい。
Q. ゲルに結合するタンパク質量が少ない	<ul style="list-style-type: none">・細胞破碎時の超音波処理が強すぎると、GSTのコンフォメーションが変化し、グルタチオンとの結合が阻害される可能性があります。より穏やかな条件で超音波処理を行って下さい。・あらかじめlysis bufferに還元剤(5mM DTT)を添加してから細胞破碎を行うと、タンパク質の収量が飛躍的に向上する場合があります。・流速が速すぎると、収率が低下します。流速を下げるか、バッチ法で結合反応をおこなうことで、収量が改善します。・カラムに不均一にゲルが充填されていると、隙間が生じ、試料がその隙間を通過してしまう場合があります。ゲルを充填し直して下さい。・カラムの結合容量(8mg GST融合タンパク質 / mLゲル)を超えている場合、結合率が低下します。アプライ量を減らして下さい。・ゲルを繰り返し使用すると、結合容量が低下してきます。製品添付のプロトコールに従って、ゲルを洗浄して下さい。 <p>注意)ゲルに固定化したグルタチオンは、E.coli lysate由来のγ-glutamyl transpeptidase活性により分解する可能性があります。</p>
Q. 溶出後の純度が低い	<ul style="list-style-type: none">・細胞破碎時の超音波処理が強すぎると、ホスト細胞由来のタンパク質が混入する可能性があります。より穏やかな条件で超音波処理を行って下さい。・GST融合タンパク質の分解の可能性があります。すべての作業を4°Cで行うか、プロテアーゼインヒビターを添加して下さい。・洗浄が不十分な可能性があります。PBSによる洗浄回数を増やして下さい。・シャペロンなどがGST融合タンパク質とともに精製されてくる場合があります。例えば、DnaK(~70kDa)の場合、精製前にcell lysate に5mM MgCl₂と5mM ATP を加えることで、混入を抑えることができます。
Q. 溶出液のタンパク質量が少ない	<ul style="list-style-type: none">・溶出時のバッファーを増やして下さい。・溶出時の流速を下げて下さい。・溶出条件(バッファー、pH条件など)を確認して下さい。 <p>注意)還元型グルタチオン濃度を50mMに上げることによって、溶出量が改善することがあります。</p>