# Glutathione Excellose® handbook

- Purification of GST fusion proteins -

**Looking for more detail Purification protocol?**

- Glutathione Excellose® Spin Kit
- Glutathione MiniExcellose®
- Glutathione Excellose®

TaKaRa

www.takara.co.kr

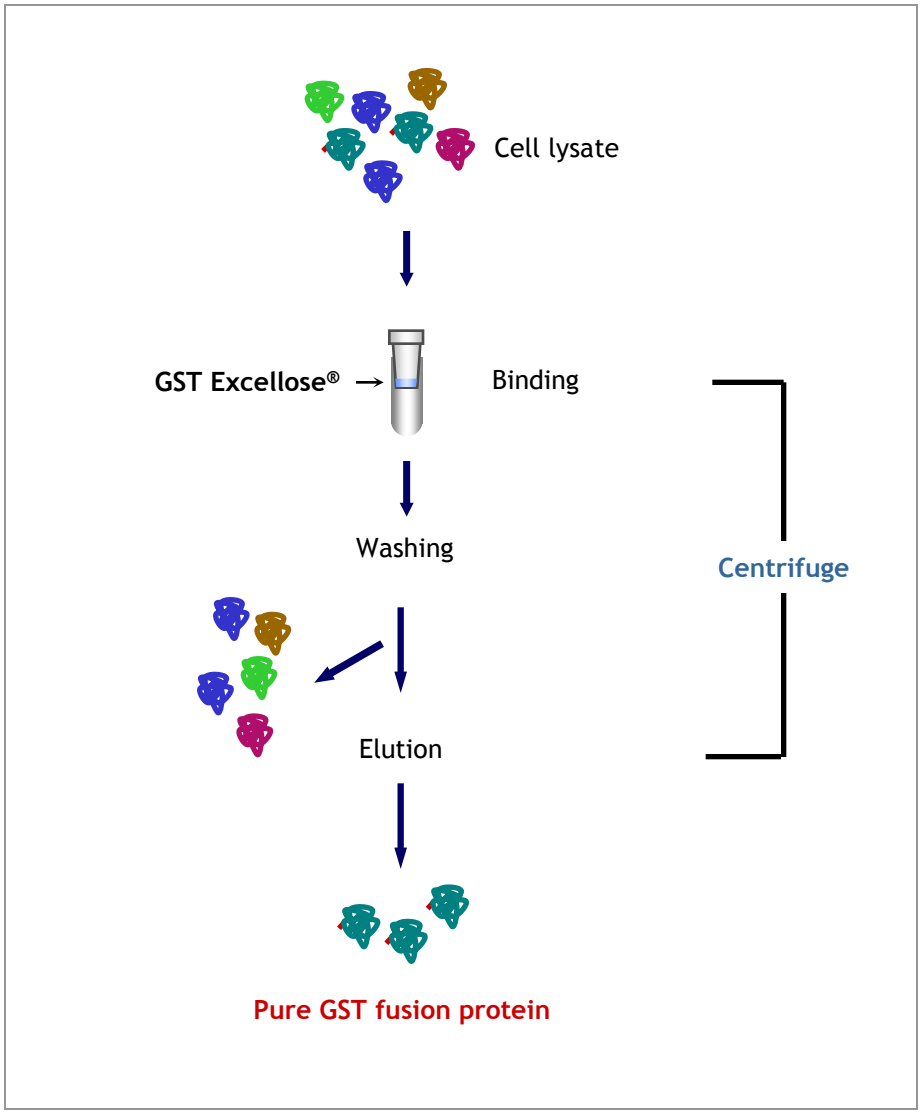
## Introduction

**Glutathione Excellose®** 는 Excellose 에 reduced glutathione을 고정화시킨 것으로 GST (glutathione S-transferase)가 glutathione과 결합하는 성질을 이용하여 정제하는 방법으로 GST 융합단백질을 정제하는데 사용되는 친화성 크로마토그래피 담체입니다.

Glutathione Excellose®는 정제 목적 및 스케일에 따라 다양한 형태로 제공되고 있습니다.

| 제품 | 사용목적 | Binding capacity | 제품 용량 | Cat. No. |
|---|---|---|---|---|
| Glutathione Excellose® Spin Kit | • 소량의 배양액(1 ml ~ 10 ml)으로 부터 단백질을 정제<br>• 단백질 정제 조건을 최적화하기 위해 한번에 많은 실험을 수행 | 75 μg/ spin column (final vol. of resin = 250 μl) | 20 rxns<br>52 rxns | AEx-GL-SK20<br>AEx-GL-SK50 |
| Glutathione MiniExcellose® | • 배양액(20 ml ~ 100 ml)으로 부터 단백질을 정제<br>• 발현율이 낮은 단백질의 정제조건을 최적화하기 위해 한번에 많은 실험을 수행 | ~ 1 mg/ column | 3 ml | AEx-GL-M03 |
| Glutathione Excellose | • 대량 단백질의 정제 | ≥ 300 μg/ resin ml | 10 ml<br>50ml<br>100 ml | AEx-GL-1<br>AEx-GL-2<br>AEx-GL-3 |

## Flow Chart of Process using Glutathione Excellose® Spin Kit



## Protocols of Glutathione Excellose® Spin Kit

크로마토그래피중에서 가장 정제 효율이 높은 흡착(affinity) 크로마토그래피는 근래에 가장 많이 일반적으로 사용되고 있는 정제 방법입니다. 그러나 높은 순도의 단백질을 얻고자 한다면 한가지 방법 혹은 일률적인 방법으로는 불가능합니다. 대부분의 경우, 최적의 정제법을 확립하기 위해서는 다소의 시행착오를 염두에 두고 행해져야 합니다. 본 메뉴얼에 제공되는 방법은 가장 일반적인 정제조건입니다. 따라서 정제하고자 하는 단백질을 고순도로 얻기 위해서는 정제조건의 변화나 다른 정제시스템이 도입되어지는 것이 바람직합니다.

- **Preparation of the cell lysate**

세포파쇄에 앞서 SDS-PAGE를 통해 정제 하고자 하는 단백질의 성질(불용성 단백질, 가용성 단백질) 및 단백질의 발현율을 확인합니다.

단백질의 발현율이 높은 경우(> 10 mg / liter)에는 원래 배양액의 5X 로 농축되어져야 합니다. 다시 말해서 정제하고자 하는 단백질이 발현율 높은 가용성 단백질이라면 10 ml의 배양액은 2 ml의 buffer* 를 첨가하여 sonication 한 후에 원심분리를 통해 상등액을 회수하면 됩니다.

단백질의 발현율이 낮은 경우 ( 2 ~ 5 mg/liter), 원래 배양액의 20X로 더 높은 농축이 필요합니다.

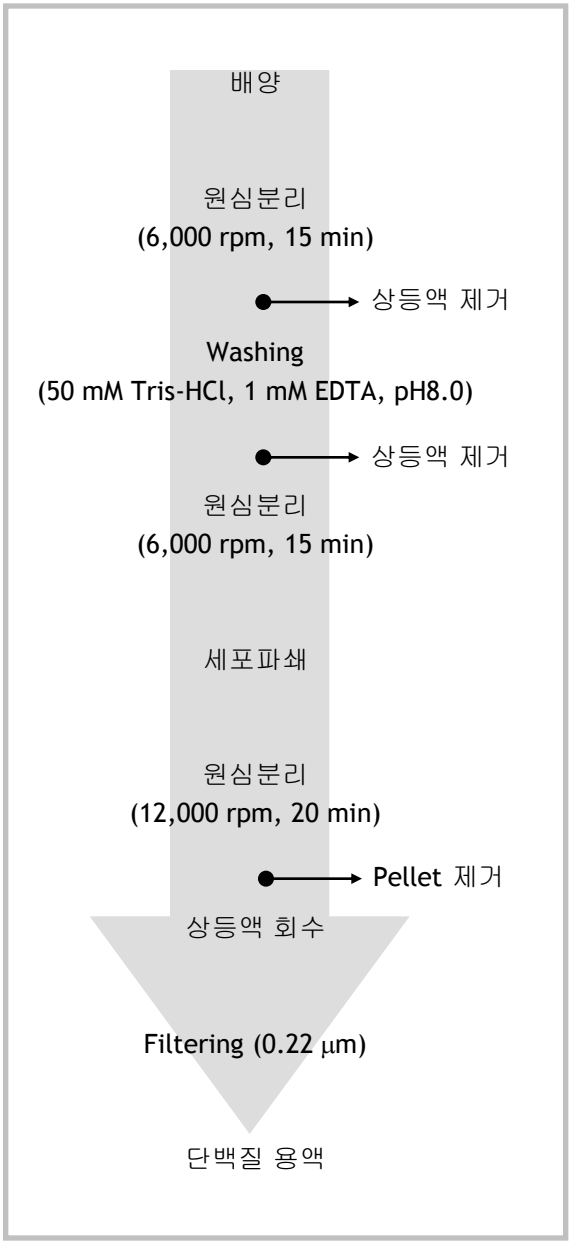
* 메뉴얼에 제공되는 정제조건을 이용할 경우 equilibration buffer를 사용하시면 됩니다. 만일 정제하고자 하는 단백질 용액과 본 메뉴얼에 사용되는 equilibration buffer가 다르다면

1) 정제하고자 하는 단백질 용액을 equilibration buffer로 바꾸거나 혹은
2) equilibration buffer를 단백질 용액과 같은 buffer system 바꿔서 사용하시면 됩니다.

ex) 단백질 용액 - 50 mM sodium acetate, 0.3 M NaCl, pH 6.0일 경우

-1) 처음부터 cell을 다시 키워서 buffer system을 맞출 수도 있고 dialysis를 이용하여 buffer 교환할 수 있습니다.
단백질 용액 : PBS, pH 7.4
Equilibration buffer : PBS, pH 7.4
Elution buffer : Equilibration buffer + 10 mM reduced glutathione

-2) 단백질 용액 - 50 mM sodium acetate, 0.3 M NaCl, pH 6.0
Equilibration buffer : 50 mM sodium acetate, 0.3 M NaCl, pH 6.0
Elution buffer : Equilibration buffer + 10 mM reduced glutathione


배양
원심분리
(6,000 rpm, 15 min)
상등액 제거
Washing
(50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0)
상등액 제거
원심분리
(6,000 rpm, 15 min)
세포파쇄
원심분리
(12,000 rpm, 20 min)
Pellet 제거
상등액 회수
Filtering (0.22 μm)
단백질 용액

Instrument and lab supplies

Table top centrifuge, 1.5ml microtubes and microtube rack

Buffers

Washing Buffer : 20mM Tris-HCl, 0.2M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4
Elution Buffer : Equilibration buffer + 10 mM maltose

**1. Collection Tube에 Spin Column을 끼운 후 마이크로튜브랙에 놓습니다.**

**2. MBP Excellose®를 잘 흔들어 섞은 후 0.5 ml 씩 컬럼에 분주합니다 (final resin vol. 0.25 ml).**

- 정확한 양을 분주하고 싶으시다면 microtube에 pipet을 이용하여 0.25 ml의 D.W.를 첨가하여 유성펜으로 표시하고 표시된 만큼 MBP Excellose® 를 첨가하여 volume을 맞추어 사용하시면 됩니다.

**3. 700 X g (약 2,000 rpm)에서 2분간 원심분리 한 후 collection tube안의 eluate를 버립니다.**

**4. Washing Buffer를 0.5 ml 가한 후 pipeting을 통하여 잘 섞어줍니다. 2분간 원심분리 한 후 collection tube안의 eluate를 버립니다.**

**5. Spin column에 단백질 용액을 0.5 ml 가하고 pipeting을 통하여 잘 섞어준 후 2분간 상온에 방치 한 후에 2분간 원심분리합니다.**

- 발현율이 낮은 단백질 용액의 경우 5번 과정을 한번 더 반복하면 정제 yield를 높일 수 있습니다.
- 원심분리 속도는 매우 중요합니다. 원심분리 속도가 너무 높다면 단백질 용액과 resin이 접촉하는 시간이 짧아져서 binding capacity가 낮아질 수 있습니다.
- 원심분리시간은 단백질 용액의 농축된 상태나 점도에 따라 더 많은 시간이 소요될 수도 있습니다.

**6. 컬럼을 통과한 flow-through fraction을 마이크로튜브에 옮겨둡니다.**

**7. Washing Buffer를 0.5 ml 가하고 pipeting을 통하여 잘 섞어준 후 2분간 원심분리합니다(필요시 2회 더 반복).**

- 발현율이 높은 단백질인 경우 washing은 2회 정도면 충부합니다. 그러나 발현율이 낮은 단백질의 경우 높은 순도의 단백질을 얻기 위해서 3회의 washing이 필요합니다.

**8. 컬럼을 통과한 wash fraction을 모아둡니다.**

**9. Elution Buffer를 0.3 ml 가하고 pipeting을 통하여 잘 섞어 2분간 상온에 방치한 후에 원심분리합니다.**

- 효율적인 elution을 위하여 최소한 첨가된 resin과 동량의 buffer를 첨가하여 pipeting으로 충분히 섞어준 후 원심분리합니다.

**10. 컬럼을 통과한 eluate를 모아 보관합니다.**

**11. SDS-PAGE를 이용하여 purification yield를 분석합니다.**

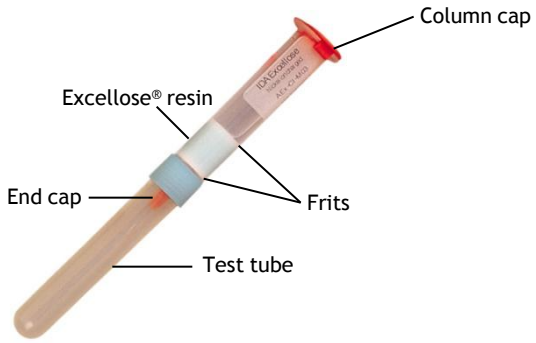
- 단백질 용액과 flow-through fraction, wash fraction, elution fraction순으로 SDS-PAGE 걸어 정제 효율을 분석합니다. 상기에 언급된 방법은 일반적인 방법으로서 사용자의 단백질 결합 특성에 따라 정제 방법이 달라질 수도 있습니다.

## Protocols of Glutathione MiniExcellose®

- **Before starting**

  메뉴얼에 제공되는 MBP Miniexcellose® 방법은 원심분리기 대신 중력을 이용한다는 부분만 다를 뿐 앞서 설명한 MBP Excellose® Spin Kit 사용방법과 유사합니다.
  본 메뉴얼에 제공되는 방법은 가장 일반적인 정제조건입니다. 그렇기 때문에 사용자의 단백질 결합 특성에 따라 정제 조건이 달라질 수도 있습니다.

  Composition of Glutathione MiniExcellose®




  Buffers

  Washing Buffer : PBS, pH 7.4
  Elution Buffer : Washing buffer + 10 mM reduced glutathione

1. **Column cap과 보존액을 제거하고 equilibration buffer 6 ml을 가합니다.**
2. **End cap을 제거하고 컬럼을 test tube와 연결하여 랙에 고정합니다.**
   - 제품에 첨가된 test tube들은 컬럼과 연결시 압력이 걸리는 것을 막기 위하여 tube 위쪽에 작은 구멍이 뚫어져 있습니다.
3. **Washing buffer 6 ml을 컬럼에 분주합니다.**
4. **중력에 의하여 모아진 equilibration buffer를 버립니다.**
5. **3, 4 단계를 한번 더 반복합니다.**
6. **컬럼에 단백질 샘플을 가하고 컬럼을 통과한 flow-through fraction을 tube에 모아둡니다.**
   - 발현율이 낮은 단백질 용액의 경우 6번 과정을 한번 더 반복하면 정제 yield를 높일 수 있습니다.

**7. 컬럼을 새 tube와 연결한 후, Washing buffer 6 ml 를 가합니다.**

**8. 컬럼을 통과한 wash fraction을 tube에 모아둡니다.**

- 발현율이 높은 단백질인 경우 washing은 2회 정도면 충부합니다. 그러나 발현율이 낮은 단백질의 경우 높은 순도의 단백질을 얻기 위해서 3회의 washing이 필요합니다.

**9. Elution Buffer를 3 ml 가하고 컬럼을 통과한 eluate를 모아 보관합니다.**

- 효율적인 elution을 위하여 최소한 첨가된 resin과 동량의 buffer를 첨가하여 elution 합니다.
- tube 위쪽에 작은 구멍이 뚫어져 있는 관계로 eluate를 보관할 때는 새로운 tube로 옮겨서 보관해주시기 바랍니다.

**10. SDS-PAGE를 이용하여 purification yield를 분석합니다.**

- 단백질 용액과 flow-through fraction, wash fraction, elution fraction순으로 SDS-PAGE 걸어 정제 효율을 분석합니다. 상기에 언급된 방법은 일반적인 방법으로서 사용자의 단백질 결합 특성에 따라 정제 방법이 달라질 수도 있습니다.

## Protocols of Glutathione Excellose®

- **Batch protocol**

Instrument and lab supplies
column, LC system

Buffers
Washing Buffer : PBS, pH 7.4
Elution Buffer : Equilibration buffer + 10 mM reduced glutathione

**1. 필요한 양만큼의 resin을 메스실린더를 이용해 분주합니다.**
**2. Resin 안에 있는 기포를 충분히 제거합니다(degasing).**
**3. Glutathione Excellose®를 기포가 들어가지 않도록 컬럼 안쪽에 유리막대를 대고 천천히 유리 막대를 따라 흘리도록 합니다.**
**4. Resin이 충분히 가라 앉으면 LC system과 연결합니다.**
**5. Packing한 resin에 resin volume의 3 ~ 5 배 정도의 D.W.를 흘려줍니다.**
**6. Equilibration Buffer를 resin volume의 5배 정도를 흘려 resin을 충분히 평형화 시킵니다.**
**7. Column에 단백질 용액을 가하여 resin과 단백질 용액이 결합되도록 합니다.**
- Packing한 resin volume의 binding capacity를 고려하여 적절한 단백질 용액을 loading 합니다.

**8. Equilibration Buffer를 resin volume의 5배 정도로 흘려 결합하지 않은 단백질과 contaminant protein을 제거합니다.**
**9. Elution Buffer를 resin volume의 2배 정도 흘려 줍니다.**
**10. Column을 통과한 fractions은 SDS-PAGE를 이용하여 purification yield를 분석합니다.**
- 단백질 용액과 flow-through fraction, wash fraction, elution fraction순으로 SDS-PAGE 걸어 정제 효율을 분석합니다. 상기에 언급된 방법은 일반적인 방법으로서 사용자의 단백질 결합 특성에 따라 정제 방법이 달라질 수도 있습니다.

- Regeneration & storage

1. Packing한 resin에 resin volume의 5 배 정도의 D.W.를 흘려줍니다.
2. Column에 resin volume의 5배 정도의 50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 8.5 용액을 흘려 줍니다.
3. 다시 resin volume의 5 배 정도의 D.W.를 흘려 줍니다.
4. Column에 다시 resin volume의 5배 정도의 100 mM sodium acetate, 0.5 M NaCl, pH 4.5 용액을 흘려 줍니다.
5. 다시 resin volume의 5 배 정도의 D.W.를 흘려 줍니다.
6. 곧바로 사용하기 위해서는 equilibration buffer를 흘려 resin을 충분히 평형화 시킨 후 정제 실험을 진행합니다.
   만일 장기간 보관할 시에는 20% ethanol 용액을 흘려 미생물로부터 resin을 보호합니다,

## Troubleshooting guide

| | |
|---|---|
| 단백질이 Glutathione Excellose®와 결합하지 않는 경우 | |
| 1) GST tag의 존재유무 확인 | sequencing을 통해 sequence 확인 및 reading frame 체크한다. |
| 2) GST tag의 glutathione bindig 부분이 단백질 구조상 안으로 숨은 경우 | 소량의 denaturants나 detergents를 첨가하여 정제 과정을 수행한다. |
| 3) 결합조건이 적합하지 않은 경우 | 모든 용액과 buffer의 pH가 같은지 확인 (resin을 평형화 시킨 buffer와 단백질 용액의 pH가 다른 경우 결합이 일어나지 않으며 aggregation이 발생할 수 도 있음) 한다. |
| 단백질이 washing 과정 중에 용출되는 경우 | |
| 1) Buffer의 문제 | 적합한 pH인지 확인한다. |
| 2) GST tag의 glutathione bindig 부분의 일부분이 단백질 구조상 안으로 숨은 경우 | 소량의 denaturants나 detergents를 첨가하여 정제 과정을 수행한다. |
| 정제과정 중 단백질이 침전되는 경우 | |
| 1) 온도 문제 | 정제과정 중 온도가 너무 낮은 경우에 발생할 수 있으며 상온에서 다시 실험을 수행한다. |
| 단백질이 elution 과정 중에 용출되지 않는 경우 | |
| 1) Elution 조건 확인 | Glutathione의 농도나 salts의 농도를 높인다. |
| 단백질이 elution 과정 중에 다른 많은 contaminant protein과 함께 용출된 경우 | |
| 1) 단백질들간의 interaction 문제 | ~ 20 mM β-mercaptoethanol을 첨가하여 S-S 결합을 약화시킨다.<br>Salts 혹은 detergent의 농도를 높여준다.<br>Washing 단계에서 buffer에 ethanol이나 glycerol을 첨가해서 washing을 수행한다. |