Glutathione Sepharose™ 4B

Glutathione Sepharose 4B est conçue pour la purification en une seule étape des glutathion-S-transférases, des protéines dépendantes du glutathion et des dérivés recombinant de la glutathion S-transférase, dont la glutathion S-transférase (GST), les protéines de fusion issues de la série de vecteurs d'expression pGEX. Les protéines de fusion GST peuvent être purifiées directement à partir de lysats bactériens à l'aide de Glutathione Sepharose 4B. Les protéines sont éluées dans des conditions délicates et non-dénaturantes douces visant à préserver l'antigénicité de la protéine et sa fonctionnalité. Le clivage de la protéine souhaité à partir de la GST se fait via une protéase spécifique du site, dont la séquence de reconnaissance se trouve immédiatement en amont du site de clonage multiple sur les plasmides pGEX.

Glutathione Sepharose 4B est également disponible dans des colonnes pratiques 4B de 1 ml et 5 ml prégarnies GSTrap™ et dans les colonnes à centrifuger prégarnies et des plaques de filtration à 96 puits (voir les *Informations de commande*).

Le tableau 1 répertorie les caractéristiques de Glutathione Sepharose 4B.

Pour des informations plus détaillées sur la production de protéines marquées GST, veuillez consulter le *GST Gene Fusion System Handbook* (voir les *Informations de commande*).

Aux États-Unis d'Amérique [USA] et dans les Territoires appartenant aux États-Unis, ce produit doit être uniquement utilisé à des fins de recherche et développement et sous la supervision directe d'une personne techniquement qualifiée.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Table des matières

1 Description du produit 3
2 Préparatifs 4
3 Purification par lots 5
4 Purification sur colonne gravité 8
5 Purification par colonne 10
6 Nettoyage du Glutathione Sepharose 4B 14
7 Stockage 14
8 Clivage de protéines marquées GST 14
9 Dépannage 22
10 Informations de commande 28

Veuillez lire attentivement ces instructions avant d'utiliser les produits.

Sécurité

Pour l'utilisation et la manipulation des produits en toute sécurité, veuillez vous référer aux fiches de données de sécurité.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

1 Description du produit

Généralité

Le ligand de glutathion est couplé par un lieur carbone-10 à 4 % d'agarose réticulé. Le couplage est optimisé pour donner une capacité de liaison élevée aux protéines marquées GST et d'autres protéines de liaison de glutathion.

La capacité de liaison totale est de > 5 mg GST/ml de milieu de chromatographie. La capacité de liaison dynamique peut varier en fonction de plusieurs facteurs tels que la protéine cible, le débit, etc.

Si l'élimination de la fraction GST (une protéine d'origine naturelle ayant un M_r 26 000) est nécessaire, la protéine marquée peut être digérée avec la protéase spécifique du site appropriée tout en étant liée au Glutathione Sepharose 4B ou sinon après l'élution. Le clivage de la protéine marquée GST au milieu de la colonne / milieu en vrac élimine l'étape supplémentaire de séparation de la protéine libérée de la GST, puisque le marquage GST reste lié. La protéine cible clivée est éluée à l'aide un tampon de liaison.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Caractéristiques du Glutathione Sepharose 4B

Tableau 1. Caractéristiques de Glutathione Sepharose 4B

Matrice	4 % d'agarose
Taille moyenne des particules	90 µm
Ligand	Glutathion et bras de liaison carbone 10
Concentration de ligand	200-400 µmol de glutathion/g de milieu lavé et séché
Capacité de liaison [1]	> 25 mg de GST de foie de cheval/ml milieu
Débit recommandé [2]	< 75 cm/h
Stabilité chimique	Stable à tous les tampons aqueux couramment utilisés. L'exposition à la NaOH 0,1 M, à l'éthanol 70 % ou au chlorhydrate de guanidine 6 M pendant 2 h à température ambiante ou à 1 % (w/v) de SDS pendant 14 jours ne provoque pas de perte significative d'activité.
Stabilité du pH	4 à 13
Température de stockage	4 à 30 °C
Tampon de stockage	éthanol 20 %

[1] La liaison de la GST au glutathion est également fonction du débit et des débits plus faibles augmentent souvent la capacité de liaison. Il est important de prendre ceci en considération pendant le chargement et l'élution des échantillons.

[2] H_2O à température ambiante.

2 Préparatifs

Préparer les tampons

L'eau et les produits chimiques utilisés pour la préparation du tampon doivent être d'une grande pureté. Il est recommandé de filtrer les tampons en les faisant passer à travers un filtre de 0,45 µm avant utilisation.

Tampon de liaison :	PBS, pH 7,3 (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,8 mM, pH 7,3)
Tampon d'élution :	Tris-HCl 50 mM, glutathion réduit 10 mM, pH 8,0

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Remarque :

Le DTT 1-10 mM peut être inclus dans le tampon de liaison et d'élution pour augmenter la pureté. Cependant, cela peut conduire à un rendement plus faible de la protéine cible.

Préparer l'échantillon

L'échantillon doit être centrifugé et/ou filtré à travers un filtre avant d'être appliqué au milieu.

Si l'échantillon est trop visqueux, le diluer avec du tampon de liaison pour éviter le colmatage de la colonne. Il n'est pas nécessaire de filtrer l'échantillon avant d'effectuer la purification par lots.

3 Purification par lots

Préparation de Glutathione Sepharose 4B

Étape	Action
1	Déterminer le volume de Glutathione Sepharose 4B nécessaire pour votre purification. ***Remarque :*** *Glutathione Sepharose 4B est livré dans 20 % d'éthanol. Préparer un coulis à 50 % pour votre purification.*
2	Secouer délicatement la bouteille de Glutathione Sepharose 4B pour remettre le coulis en suspension.
3	Utiliser une pipette ou un cylindre de mesure afin de retirer suffisamment de coulis à utiliser et transférer dans un tube approprié.
4	Sédimenter le milieu par centrifugation à 500 g pendant 5 min. Décanter soigneusement le surnageant.
5	Laver le Glutathione Sepharose 4B en ajoutant 5 ml de tampon de liaison pour 1 ml de chaque coulis. Inverser pour mélanger.
6	Sédimenter le milieu par centrifugation à 500 g pendant 5 min. Décanter soigneusement le surnageant.
7	Répétez encore une fois les étapes 5 et 6.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Procédure de purification

Instructions

Étape	Action
1	Ajouter le lysat cellulaire au Glutathione Sepharose 4B préparé et incuber pendant au moins 30 min à la température ambiante. Utiliser une agitation délicate telle que la rotation de bout en bout.
2	Utiliser une pipette ou un cylindre pour transférer le mélange dans un récipient ou tube approprié.
3	Sédimenter le milieu de chromatographie par centrifugation à 500 × g pendant 5 min. Décanter soigneusement le surnageant (= circulant) et le conserver pour mesurer l'efficacité de liaison au milieu, c'est à dire par SDS-PAGE.
4	Laver le Glutathione Sepharose 4B en ajoutant 5 ml de tampon de liaison pour 1 ml de chaque coulis. Inverser pour mélanger.
5	Sédimenter le milieu par centrifugation à 500 × g pendant 5 min. Décanter soigneusement le surnageant (= lavage) et le conserver pour analyse par SDS-PAGE.
6	Répéter les étapes 4 et 5 deux fois pour un total de trois lavages.
7	La protéine liée doit être éluée par l'ajout de 0,5 ml de tampon d'élution par ml de coulis Glutathione Sepharose 4B. Incuber à température ambiante pendant 5 à 10 min avec une agitation délicate comme la rotation de bout en bout.
8	Sédimenter le milieu par centrifugation à 500 × g pendant 5 min. Décanter soigneusement le surnageant (protéine éluée).
9	Répétez les étapes 7 et 8 deux fois pour un total de trois élutions. Vérifiez les trois éluats séparément pour déceler les protéines purifiées et les grouper selon les résultats.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Remarques importantes

- En raison de la cinétique relativement lente caractérisant la liaison entre la GST et le glutathion, il est important de laisser pauser suffisamment de temps afin d'atteindre la capacité de liaison maximale. L'efficacité de liaison peut varier considérablement d'une protéine marquée GST à une autre.
- Les volumes et les temps utilisés pour l'élution peuvent varier selon la protéine. En conséquence, des élutions supplémentaires avec des concentrations plus élevées de glutathion peuvent s'avérer nécessaires. Le matériau traversant, lavé et élué du milieu doit être surveillé pour déceler des protéines marquées GST à l'aide de la SDS-PAGE en combinaison avec Western Blot si nécessaire.
- Le GST Detection Module (voir les *Informations de commande*) peut être utilisé pour optimiser les conditions d'élution ou pour garder la trace des étapes de purification d'une protéine marquée GST. Il est conçu pour identifier les protéines marquées GST via une substance biochimique ou un dosage immunologique.
- La concentration en protéines marquées GST peut être estimée en mesurant l'absorbance à 280 nm. Il est possible de calculer par approximation le marquage GST à l'aide de la conversion ; A_{280} ~ 1 correspond à ~ 0,5 mg/ml.
- La concentration en protéine marquée GST peut également être déterminée par des procédés chromogènes standard (par exemple, des dosages de Lowry, BCA et de Bradford). S'il est nécessaire d'avoir recours aux dosages Lowry ou BCA, l'échantillon doit être initialement soumis à un échange de tampon en utilisant un HiTrap™ Desalting en colonne ou dialysé par rapport au PBS pour éliminer le glutathion, susceptible d'interférer avec la mesure protéinique. La méthode de Bradford peut être utilisée en présence de glutathion.
- La réutilisation de Glutathione Sepharose 4B dépend de la nature de l'échantillon et ne doit être effectuée qu'avec des échantillons identiques afin d'empêcher toute contamination croisée.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

4 Purification sur colonne gravité

Solution

Pour chaque purification, retirer le couvercle supérieur d'une colonne jetable, et placer la colonne à la verticale dans un support approprié.

Étape	Action
1	Déterminer le volume moyen de Glutathione Sepharose 4B nécessaire pour votre purification. ***Remarque :*** *Glutathione Sepharose 4B est livré dans 20 % d'éthanol. Préparer un coulis à 50 % pour votre purification.*
2	Secouer délicatement la bouteille de Glutathione Sepharose 4B pour remettre le coulis en suspension.
3	Utiliser une pipette ou une éprouvette de mesure afin de retirer suffisamment de coulis à utiliser et transférer dans la colonne. Appuyer sur la colonne pour déloger les bulles d'air piégées dans la matrice du milieu de chromatographie. Laisser reposer.
4	Retirer le bouchon de fond et le conserver pour le réutiliser ultérieurement. Laisser la colonne se vider. ***Remarque :*** *Une légère pression avec le pouce ganté sur le dessus de la colonne peut être nécessaire pour faire écouler le liquide.*
5	Laver le Glutathione Sepharose 4B avec au moins 5 volumes de colonne de tampon de liaison. Laisser la colonne se vider. Remettre le bouchon de fond. ***Remarque :*** *Le Glutathione Sepharose 4B doit être soigneusement lavé avec le tampon de liaison pour éliminer la solution de stockage de 20 % d'éthanol. Les résidus d'éthanol sont susceptibles d'interférer avec les procédures ultérieures.*

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Liaison

Étape	Action
1	Utiliser une pipette pour appliquer le produit bactérien clarifié au milieu dans la colonne Glutathione Sepharose 4B.
2	Retirer le bouchon d'extrémité et faites traverser le produit soniqué. ***Remarque :*** *Recueillir le flux en circulation et le conserver pour une analyse ultérieure par SDS-PAGE ou le dosage CDNB à l'aide de GST Detection Module (voir les Informations de commande) pour mesurer l'efficacité de la liaison au milieu.*
3	Laver le milieu avec 5 volumes de colonne de tampon de liaison. Laisser la colonne se vider.
4	Répéter deux fois supplémentaires pour un total de trois lavages. ***Remarque :*** *À ce stade, la protéine liée au support pourra être éluée directement en utilisant un tampon d'élution. Le cas échéant, les protéines marquées GST peuvent être clivées en étant encore liées au milieu avec PreScission™ Protease, à la thrombine ou au facteur Xa pour libérer la protéine d'intérêt à partir de la fraction GST.* *Les procédures détaillées sont fournies dans la section Clivage des protéines marquées GST.*
5	Une fois que la colonne avec la protéine liée a été lavée et égouttée, remplacer le bouchon de fond.

Élution

Étape	Action
1	La protéine liée doit être éluée par l'ajout de 0,5 ml de tampon d'élution par ml de volume de matrice Glutathione Sepharose 4B. Incuber la colonne à la température ambiante (22-25 C) pendant 10 min pour éluer la protéine marquées GST.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Étape	Action
2	Retirer le bouchon de fond, et recueillir l'éluat. Celui-ci contient la protéine marquée GST.
3	Répétez les étapes 1 et 2 deux fois pour un total de trois élutions.
4	Vérifiez les trois éluats séparément pour déceler les protéines purifiées et grouper ceux qui contiennent de la protéine.

Remarques importantes

- En suivant les étapes d'élution, une quantité importante de protéine marquée peut rester liée au milieu. Les volumes et les temps utilisés pour l'élution peuvent varier selon la protéine. Des élutions supplémentaires peuvent être nécessaires. Les éluats doivent être surveillés pour la protéine marquée GST par SDS-PAGE ou par dosage CDNB à l'aide de GST Detection Module (voir les *Informations de commande*)
- Le rendement de la protéine marquée peut être estimé en mesurant l'absorbance à 280 nm. Pour le marquage d'affinité GST, A_{280} ~ 1 correspond à environ 0,5 mg/ml. Le rendement de protéines marquées GST peut également être déterminé par des procédés chromogènes standard (par exemple, des dosages de Lowry, BCA et de Bradford etc.). Si une méthode de type Lowry ou BCA doit être utilisée, la glutathion doit être enlevée, par exemple par échange de tampon en utilisant des colonnes de dessalage telles que HiTrap Desalting ou PD-10 Disposable selon le volume de l'échantillon. La méthode de Bradford peut être exécutée en présence de glutathion.

5 Purification par colonne

Colonnes

GE propose de nombreux types de colonnes à utiliser pour la purification par colonne.

Les colonnes proposées sont répertoriées ci-dessous (voir les *Informations de commande*) :

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

- Tricorn™ 10/100 (d.i. 10 mm) pour les volumes de matrice jusqu'à 8,5 ml avec des hauteurs allant jusqu'à 10,8 cm.
- XK 16/20 (d.i. 16 mm) pour les volumes de matrice jusqu'à 30 ml à des hauteurs allant jusqu'à 15 cm.
- XK 26/20 (d.i. 26 mm) pour les volumes de matrice jusqu'à 80 ml à des hauteurs allant jusqu'à 15 cm.
- Colonnes prégarnies de GSTrap 4B 1 ml et GSTrap 4B 5 ml.

Conditionnement de la colonne

Étape	Action
1	Équilibrer les matériaux à la température à laquelle la purification sera effectuée.
2	Éliminer l'air en rinçant les pièces d'extrémité de la colonne avec le tampon de liaison. S'assurer qu'aucune bulle d'air n'est piégée sous le filet de colonne. Fermer la sortie de la colonne en laissant 1 à 2 cm de tampon de liaison restant dans la colonne de liaison.
3	Secouer délicatement la bouteille de Glutathione Sepharose 4B pour remettre le coulis en suspension.
4	Estimer la quantité de coulis nécessaire.
5	Verser le coulis. Verser sur une tige de verre maintenue contre la paroi de la colonne permet de minimiser l'introduction de bulles d'air.
6	Remplir immédiatement la colonne avec le tampon de liaison, monter la pièce supérieure appropriée sur la colonne et relier la colonne à une pompe.
7	Ouvrir la sortie de la colonne et régler la pompe pour qu'elle fonctionne au débit souhaité. [1]
8	Garder le débit de remplissage pendant au moins 3 volumes de la matrice après avoir atteint une hauteur de matrice constante. Marquer la hauteur de la matrice sur la colonne. ***Remarque :*** *Ne pas dépasser 75 % du débit de remplissage lors de la purification.*

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Étape	Action
9	Arrêter la pompe et fermer la sortie de la colonne. Retirer la pièce supérieure de la colonne et remplir soigneusement le reste de la colonne avec du tampon de liaison afin de former un ménisque vers le haut au sommet.
10	Insérer l'adaptateur dans la colonne à un angle, veiller à ce que l'air ne soit pas coincé sous le filet.
11	Faites glisser l'adaptateur lentement dans la colonne (la sortie de l'adaptateur est ouverte) jusqu'à ce que la marque soit atteinte (voir l'étape 8). Verrouiller l'adaptateur en place. Raccorder la colonne à une pompe ou un système de chromatographie et commencer équilibrage. Le cas échéant, repositionner l'adaptateur.

[1] Idéalement, les milieux Sepharose 4B sont garnis à une pression constante ne dépassant pas 1 bar (0,1 MPa) dans les colonnes XK. Si le matériel de garnissage ne comprend pas de jauge de pression, utiliser un débit de remplissage maximum de livraison de 2,5 ml/mn maximum, 75 cm/h (colonne XK 16/20) ou 1 ml/mn, 75 cm/h (colonne Tricorn 10/100). Si la pression ou le débit recommandé ne peuvent pas être obtenus, utiliser le débit maximal que la pompe peut fournir. Cela devrait également donner une matrice relativement bien remplie.

Procédure de purification

Étape	Action
1	Équilibrer la colonne avec env. 5 volumes de colonne de tampon de liaison.
2	Appliquer l'échantillon centrifugé et/ou filtré.
3	Laver la colonne avec 5-10 volumes de colonne de tampon de liaison ou jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de matériau dans le flux en circulation. Garder le flux de circulation pour mesurer l'efficacité de liaison au milieu, c'est-à-dire par SDS-PAGE.
4	La protéine liée doit être éluée avec 5 à 10 volumes de colonne de tampon d'élution.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Remarques importantes

- L'un des paramètres les plus importants qui affectent la liaison des protéines marquées GST ou d'autres protéines de liaison de glutathion à Glutathione Sepharose 4B est le débit. En raison de la cinétique relativement lente caractérisant la liaison entre la GST et le glutathion, il est important de laisser pauser suffisamment de temps afin d'atteindre la capacité de liaison maximale. Caractéristiques des protéines, pH et température sont d'autres facteurs qui peuvent affecter la capacité de liaison.
- Les volumes et les temps utilisés pour l'élution peuvent varier selon la protéine. En conséquence, des élutions supplémentaires avec des concentrations plus élevées de glutathion peuvent s'avérer nécessaires. Le matériau traversant, lavé et élué du milieu doit être surveillé pour déceler des protéines marquées GST à l'aide de la SDS-PAGE en combinaison avec Western Blot si nécessaire.
- Le GST Detection Module (voir les *Informations de commande*) peut être utilisé pour optimiser les conditions d'élution ou pour garder la trace des étapes de purification d'une protéine marquée GST. Il est conçu pour identifier les protéines marquées GST via une substance biochimique ou un dosage immunologique.
- La concentration en protéines marquées GST peut être estimée en mesurant l'absorbance à 280 nm. Il est possible de calculer par approximation le marquage GST à l'aide de la conversion ; A_{280} ~ 1 correspond à ~ 0,5 mg/ml.
- La concentration en protéine marquée GST peut également être déterminée par des procédés chromogènes standard (par exemple, des dosages de Lowry, BCA et de Bradford). S'il est nécessaire d'avoir recours aux dosages Lowry ou BCA, l'échantillon doit être initialement soumis à un échange de tampon en utilisant une colonne HiTrap Desalting ou dialysé par rapport au PBS pour éliminer le glutathion, susceptible d'interférer avec la mesure protéinique. La méthode de Bradford peut être utilisée en présence de glutathion.
- La réutilisation de Glutathione Sepharose 4B dépend de la nature de l'échantillon et ne doit être effectuée qu'avec des échantillons identiques afin d'empêcher toute contamination croisée.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

6 Nettoyage du Glutathione Sepharose 4B

Si le milieu de chromatographie semble perdre sa capacité de liaison, cela peut être dû à une accumulation de précipité dénaturé ou à des protéines non spécifiquement liées.

Élimination des substances précipitées ou dénaturées :	Laver avec 2 volumes de colonne de chlorhydrate de guanidine 6 M, immédiatement suivis de 5 volumes de colonne de PBS, pH 7,3.
Élimination des substances hydrophobes liées :	Laver avec 3-4 volumes de colonne d'éthanol à 70 % ou 2 volumes de colonne de Triton™ X-100 1 %, immédiatement suivis de 5 volumes de colonne de PBS, pH 7,3.

7 Stockage

Conserver le Glutathione Sepharose 4B entre +4 et 30 °C dans l'éthanol à 20 %.

8 Clivage de protéines marquées GST

Introduction

Dans la plupart des cas, le partenaire de fusion concerné conserve une activité fonctionnelle et le test fonctionnel peut se faire à l'aide de la fusion intacte avec la GST. Si l'élimination du marquage GST, est nécessaire, il est possible de cliver les protéines marquées qui présentent un site de reconnaissance PreScission Protease, un site de reconnaissance de la thrombine ou du facteur Xa, soit en étant liées à Glutathione Sepharose 4B, soit en solution après élution.

Opter pour le clivage après élution est suggéré s'il est nécessaire d'optimiser les conditions de clivage. Les échantillons peuvent être facilement enlevés sur différentes périodes de temps et analysés par la SDS-PAGE afin d'en évaluer le rendement, la pureté et l'étendue de la digestion. La quantité de protéase utilisée, la température et la durée d'incubation nécessaires pour la digestion complète peuvent varier en fonction de la protéine de fusion.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Il convient de déterminer les conditions optimales pour chaque protéine marquée par des expériences pilotes, en réduisant par exemple le temps d'incubation et en ajoutant une plus grande quantité d'enzyme.

PreScission Protease

Généralité

PreScission Protease, M_r 46 000.

Tampon de clivage PreScission : Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, dithiothréitol (DTT) 1 mM, pH 7,5.

Clivage PreScission Protease de la protéine marquée GST lié au milieu de la colonne/en vrac

Hypothèse : 8 mg de protéines marquées GST liées/ml de milieu de chromatographie.

Étape	Action
1	Suivre les étapes 1 à 6 dans la *Purification de lots* ou les étapes 1 à 3 dans la *Purification de la colonne*.
2	Laver la protéine marquée liée Glutathione Sepharose 4B avec 10 volumes de matrice de tampon de clivage PreScission.
3	Préparer le mélange PreScission Protease : Pour chaque ml de volume de matrice de Glutathione Sepharose 4B, préparer un mélange de 80 µl (160 unités) de PreScission Protease et 920 µl de tampon de clivage PreScission à +4 °C. (8 mg de protéines marquées/ml milieu).
4	Verser le mélange PreScission Protease dans la colonne. Sceller la colonne. Si le format de lot est utilisé, ajouter le mélange PreScission Protease au pellet Glutathione Sepharose 4B. Secouer délicatement ou faire pivoter la suspension.
5	Incuber à + 4 C pendant 4 heures.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Étape	Action
6	Après l'incubation, laver la colonne avec env. 3 volumes de matrice de tampon de clivage PreScission. Recueillir l'éluat dans les différents tubes pour éviter de diluer la protéine de fusion et l'analyser. Si le format en lot est utilisé, centrifuger la suspension à 500 × g pendant 5 minutes pour le pellet de Glutathione Sepharose 4B et transférer délicatement l'éluat dans un tube. L'éluat contient la protéine d'intérêt, tandis que la partie de la TPS de la protéine marquée et le PreScission Protease resteront liés à Glutathione Sepharose 4B.

Clivage PreScission Protease de la protéine marquée GST éluée

Hypothèse : 8 mg de protéines de fusion GST liées/ml de milieu de chromatographie.

Étape	Action
1	Éliminer le glutathion réduit de l'éluat par un échange de tampon rapide sur HiTrap Desalting, une colonne PD-10 ou HiPrep™ 26/10 Desalting en fonction du volume de l'échantillon, ou dialyser contre un tampon de clivage PreScission.
2	Ajouter 1 µl (2 U) de PreScission Protease pour chaque 100 µg de protéine marquée dans l'éluat. Si la quantité de protéine marquée dans l'éluat n'a pas été déterminée, ajouter 80 µl (160 unités) de PreScission Protease pour chaque ml de volume de matrice Glutathione Sepharose 4B. (8 mg de protéines marquées liées/ml de milieu).
3	Incuber à + 4 C pendant 4 heures.
4	Une fois que la digestion est terminée, appliquer l'échantillon au Glutathione Sepharose 4B lavé et équilibré afin de retirer la fraction GTS de la protéine marquée et la PreScission Protease de la protéine d'intérêt.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Étape	Action
5	Incuber pendant 20 à 30 min à température ambiante.
6	Sédimenter le milieu par centrifugation à 500 g pendant 5 min. La protéine d'intérêt pourra être identifiée dans le surnageant.

Thrombine

Généralité

Thrombine, M_r 37 000.

Tampon de clivage de la thrombine : PBS, pH 7,3.

Préparation de la solution de thrombine :

1 Dissoudre 500 U de thrombine dans 500 µl de PBS froid, pH 7,3 (1 U/µl).

2 Agiter délicatement pour dissoudre.

3 Congeler des aliquotes de 80 µl et les conserver à -80 °C.

Clivage de la thrombine de la protéine marquée GST liée à la colonne/au milieu en vrac

Hypothèse : 8 mg de protéines marquées GST liées/ml de milieu de chromatographie.

Étape	Action
1	Suivre les étapes 1 à 6 dans la *Purification de lots* ou les étapes 1 à 3 dans la *Purification de la colonne*.
2	Laver la protéine marquée liée au Glutathione Sepharose 4B avec 10 volumes de matrice de tampon de clivage de thrombine.
3	Préparer le mélange de thrombine : pour chaque ml de volume de matrice de Glutathione Sepharose 4B, préparer un mélange de 80 µl (80 unités) de thrombine et 920 µl de PBS, pH 7,3 (8 mg de protéines marquées et liées/ml de milieu).

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Étape	Action
4	Verser le mélange de thrombine dans la colonne. Sceller la colonne. Si le format de lot est utilisé, ajouter le mélange au pellet de Glutathione Sepharose 4B. Secouer délicatement ou faire pivoter la suspension.
5	Incuber à température ambiante (22-25 °C) pendant une période comprise entre 2 et 16 heures.
6	Après l'incubation, laver la colonne avec env. 3 volumes de matrice de PBS, pH 7,3. Recueillir l'éluat dans les différents tubes pour éviter de diluer la protéine marquée et l'analyser. Si le format en lot est utilisé, centrifuger la suspension à 500 × g pendant 5 minutes pour le pellet de Glutathione Sepharose 4B et transférer délicatement l'éluat dans un tube. L'éluat contient la protéine d'intérêt et la thrombine tandis que la partie de la GTS de la protéine marquée et restera liée au Glutathione Sepharose 4B.

Clivage de la thrombine de la protéine marquée GST éluée

Hypothèse : 8 mg de protéines de fusion GST liées/ml de milieu de chromatographie.

Étape	Action
1	Éliminer le glutathion réduit de l'éluat par un échange de tampon rapide sur HiTrap Desalting, une colonne PD-10 ou HiPrep 26/10 Desalting en fonction du volume de l'échantillon, ou dialyser par rapport à un tampon de clivage de thrombine.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Étape	Action
2	Ajouter 10 µl (10 unités) d'une solution de thrombine par mg de protéine marquée dans l'éluat. Si la quantité de protéine marquée dans l'éluat n'a pas été déterminée, ajouter 80 µl (80 unités) de solution de thrombine pour chaque ml de volume de matrice Glutathione Sepharose 4B à partir duquel la protéine marquée a été éluée. (8 mg de protéine de fusion liée/ml de milieu).
3	Incuber à température ambiante (22-25 °C) pendant une période comprise entre 2 et 16 heures.
4	Une fois que la digestion est terminée, la GST peut être enlevée en retirant d'abord le glutathion via un échange de tampon rapide sur HiTrap Desalting, une colonne PD-10 ou HiPrep 26/10 Desalting selon le volume de l'échantillon, ou par dialyse contre du PBS, pH 7,3. Poursuivez ce processus en appliquant l'échantillon à Glutathione Sepharose 4B lavé et équilibré.
5	Incuber pendant 20 à 30 min à température ambiante.
6	Sédimenter le milieu par centrifugation à 500 g pendant 5 min. Le surnageant contient la protéine d'intérêt et la thrombine tandis que la partie de la GST de la protéine marquée et restera lié au Glutathione Sepharose 4B.

Facteur Xa

Généralité

Facteur Xa, M_r 48 000.

Remarque :

Le facteur Xa se compose de deux sous-unités liées par des ponts de disulfure. Étant donné que le glutathion peut perturber les ponts de disulfure, il convient de le retirer de l'échantillon avant la réaction de clivage.

Tampon de clivage du facteur Xa : Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, $CaCl_2$ 1 mM, pH 7,5

Préparation de la solution de facteur Xa :

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

1 Dissoudre 400 U de facteur Xa dans 400 µl d'eau froide froid (1 U/µl).

2 Agiter délicatement pour dissoudre.

3 Congeler des aliquotes de 80 µl et les conserver à -80 °C.

Clivage du facteur Xa de la protéine marquée GST liée à la colonne/au milieu en vrac

Hypothèse : 8 mg de protéines marquées GST liées/ml de milieu de chromatographie.

Étape	Action
1	Suivre les étapes 1 à 6 dans la *Purification de lots* ou les étapes 1 à 3 dans la *Purification de la colonne*.
2	Laver la protéine marquée liée au Glutathione Sepharose 4B avec 10 volumes de matrice de tampon de clivage de facteur Xa.
3	Préparer le mélange de facteur Xa : Pour chaque ml de volume de matrice Glutathione Sepharose 4B, préparer un mélange de 80 µl (80 unités) facteur Xa et 920 µl de tampon de clivage de facteur Xa, (8 mg de protéine marquée liée/ml milieu).g
4	Verser le mélange de facteur Xa dans la colonne. Sceller la colonne. Si le format de lot est utilisé, ajouter le mélange de facteur Xa au pellet de Glutathione Sepharose 4B. Secouer délicatement ou faire pivoter la suspension.
5	Incuber à température ambiante (22-25 °C) pendant une période comprise entre 2 et 16 heures.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Étape	Action
6	Après l'incubation, laver la colonne avec env. 3 volumes de matrice de tampon de clivage de facteur Xa. Recueillir l'éluat dans les différents tubes pour éviter de diluer la protéine marquée et l'analyser. Si le format en lot est utilisé, centrifuger la suspension à 500 × g pendant 5 minutes pour le pellet de Glutathione Sepharose 4B et transférer délicatement l'éluat dans un tube. L'éluat contient la protéine d'intérêt et le facteur Xa, tandis que la partie de la GST de la protéine marquée restera lié au Glutathione Sepharose 4B.

Clivage du facteur Xa de la protéine marquée GST éluée

Hypothèse : 8 mg de protéines de fusion GST liées/ml de milieu de chromatographie.

Étape	Action
1	Éliminer le glutathion réduit de l'éluat par un échange de tampon rapide sur HiTrap Desalting, une colonne PD-10, ou HiPrep 26/10 Desalting en fonction du volume de l'échantillon, ou dialyser par rapport à un tampon de clivage du facteur Xa.
2	Ajouter 10 µl (10 unités) d'une solution de facteur Xa par mg de protéine marquée dans l'éluat. Si la quantité de protéine marquée dans l'éluat n'a pas été déterminée, ajouter 80 µl (80 unités) de solution de facteur Xa pour chaque ml de volume de matrice Glutathione Sepharose 4B à partir duquel la protéine marquée a été éluée. (8 mg de protéines marquées liées/ml de milieu).
3	Incuber à température ambiante (22-25 °C) pendant une période comprise entre 2 et 16 heures.
4	Une fois que la digestion est terminée, appliquer l'échantillon au Glutathione Sepharose 4B lavé et équilibre afin d'éliminer la fraction de GTS de la protéine marquée.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Étape	Action
5	Incuber pendant 20 à 30 min à température ambiante.
6	Sédimenter le milieu par centrifugation à 500 g pendant 5 min. La protéine d'intérêt se trouve dans le surnageant avec le facteur Xa.

9 Dépannage

La protéine marquée GST ne se lie pas au Glutathione Sepharose 4B

- **Protéine marquée GST dénaturée par passage aux ultrasons :** Des ultrasons trop importants peuvent peut dénaturer la protéine marquée et en empêcher sa liaison à Glutathione Sepharose 4B. Procéder au passage aux ultrasons dans des conditions douces pendant la lyse cellulaire. Les conditions de passage aux ultrasons doivent être déterminées de manière empirique.
- **Ajouter du DTT avant la lyse cellulaire et aux tampons :** Ajouter du DTT à une concentration finale de 1-10 mM peut augmenter de manière significative la liaison de certaines protéines marquées GST à Glutathione Sepharose 4B.
- **Tester la liaison de GST du pGEX parental :** Préparer un sonicat de cellules hébergeant le plasmide pGEX parental et vérifier la liaison à la matrice. Si la GST produite à partir du plasmide parental se lie avec une affinité élevée, c'est que la protéine de fusion peut avoir modifié la conformation de la GST, en diminuant son affinité. Il est possible d'obtenir des résultats satisfaisants en réduisant la température utilisée pour la liaison à + 4 °C, et en limitant le lavage de la colonne.
- **Équilibrer le Glutathione Sepharose 4B avant utilisation :** La liaison des protéines marquées GST au Glutathione Sepharose 4B n'est pas efficace à un pH inférieur à 6,5 ou supérieur à 8. Vérifier que le Glutathione Sepharose 4B a été équilibré avec un tampon dont le pH est compris entre 6,5 et 8,0 (par ex., le PBS) avant d'appliquer le lysat cellulaire clarifié.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

- **Utiliser du Glutathione Sepharose 4B frais :** Si le Glutathione Sepharose 4B a déjà été utilisé plusieurs fois, il peut être nécessaire d'utiliser du Glutathione Sepharose 4B frais. Voir aussi la section *Nettoyage de Glutathione Sepharose 4B*.
- **Diminuer le débit lors du chargement de l'échantillon.**

L'élution de la protéine marquée GST ne se fait pas efficacement depuis Glutathione Sepharose 4B

Augmenter le temps utilisé pour l'élution : Diminuer le débit pendant l'élution.

Augmenter le volume du tampon d'élution : Parfois, surtout après le clivage sur colonne de la protéine marquée, un plus grand volume de tampon peut être nécessaire afin d'éluer la protéine marquée.

Augmenter la concentration de glutathion dans le tampon d'élution : Les 10 mM recommandées dans le présent protocole devraient être suffisantes pour la plupart des applications, mais des exceptions existent. Essayer HCl 50 mM, glutathion réduit 20 à 40 mM, pH 8,0 comme tampon d'élution.

Augmenter le pH du tampon d'élution : Un pH faible peut limiter l'élution depuis Glutathione Sepharose 4B. L'augmentation du pH du tampon d'élution à une valeur de 8 à 9 peut améliorer l'élution sans avoir à augmenter la concentration de glutathion utilisée pour l'élution.

Augmenter la force ionique du tampon d'élution : L'ajout de NaCl 0,1 à 0,2 M au tampon d'élution peut également améliorer les résultats.

Utiliser un tampon d'élution frais (glutathion réduit).

Ajouter un détergent non ionique au tampon d'élution : Les interactions hydrophobes non spécifiques peuvent empêcher la solubilisation et l'élution de protéines marquées depuis Glutathione Sepharose 4B. Ajouter un détergent non ionique peut améliorer les résultats. L'ajout de Triton X-100 0,1 % ou de N-octylglucoside 2 % peut améliorer de manière significative l'élution de certaines protéines marquées GST.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Les bandes multiples sont observées après électrophorèse / analyse de type Western Blotting de la protéine cible éluée

- La protéine de **M_r 70 000 est co-purifiée avec la protéine marquée GST :** La protéine de M_r 70 000 est probablement un produit protéinique du gène *dnaK* de *E. coli*. Cette protéine est impliquée dans le repliement des protéines dans *E. coli*. Il a été rapporté que cette association peut être perturbée par l'incubation de la protéine marquée dans du Tris-HCl 50 mM, ATP 2 mM, $MgSO_4$ 10 mM, pH 7,4 pendant 10 min à +37 °C avant le chargement surGlutathione Sepharose 4B.
  Il est également possible d'éliminer la protéine DnaK en faisant passer la solution de protéine marquée sur agarose ATP ou échange d'ions.
- **Ajouter un inhibiteur de protéase :** Les bandes multiples peuvent être le résultat d'une dégradation partielle de protéines marquées par des protéases. L'ajout de PMSF 1 mM à la solution de lyse peut améliorer les résultats. Une alternative non toxique, soluble dans l'eau, au PMSF est le chlorhydrate de fluorure de 4-(2-aminoéthyl)-benzènesulfonyle (AEBSF), disponible dans le commerce sous le nom de Pefabloc™ SC chez Boehringer Mannheim.
  Remarque :
  Les inhibiteurs de la sérine protéase doivent être éliminés avant le clivage par la thrombine ou le facteur Xa. La sérine protéase PreScission Protease ne fait pas consensus et elle est insensible à de nombreux inhibiteurs de la sérine protéase testés par GE.
- **Utiliser un hôte déficient en protéase :** Les bandes multiples peuvent être le résultat d'une protéolyse dans les bactéries hôtes. Si tel est le cas, l'utilisation d'une souche déficiente en hôte peut être nécessaire (par ex. *lon-* ou *ompT*). *E. coli* BL21 est fournie avec les vecteurs pGEX. Cette souche est *ompT*.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

- **Diminuer le passage aux ultrasons :** La rupture des cellules est apparente par un effacement partiel de la suspension et peut être vérifiée par un examen microscopique. L'ajout de lysozyme (0,1 volume de solution de lysozyme à10 mg/ml dans du Tris-HCl 25 mM, pH 8,0) avant le passage aux ultrasons peut améliorer les résultats. Éviter le moussage pour ne pas risquer de dénaturer la protéine de fusion. Un excès de passage aux ultrasons, peut également conduire à la co-purification des protéines de l'hôte avec la protéine marquée GST.
- I**nclure une étape de purification supplémentaire :** Des bandes supplémentaires peuvent être dues à la co-purification de diverses protéines connues comme les chaperonines qui sont impliquées dans le repliement correct des protéines naissantes dans *E. coli*. Ceux-ci incluent, mais ne se limitent pas à : DnaK (M_r ~ 70 000), DnaJ (M_r ~ 37 000), GrpE (M_r ~ 40 000), GroEL (M_r ~ 57 000) et GroES (M_r ~ 10 000). Plusieurs méthodes de purification de protéines marquées GST de ces protéines de co-purification ont été décrites.
- **Absorption croisée d'anticorps avec les protéines E. coli :** En fonction de la source de l'anticorps anti-GST, il peut contenir des anticorps qui réagissent avec les différentes protéines de *E. coli* pouvant être présentes dans l'échantillon de protéine marquée. Effectuer l'adsorption croisée de l'anticorps avec un sonicat d'*E. coli* pour enlever les anticorps anti-*E. coli* à partir de la préparation. L'anticorps anti-GST de GE a subi l'adsorption croisée par rapport aux protéines de *E. coli* et été testé pour vérifier son absence de liaison de fond spécifique dans Western Blots.

Clivage incomplet de protéines marquées GST

- **Les rapports des taux de PreScission Protease, de thrombine ou de facteur Xa à ceux des taux de protéine de fusion sont incorrects :** Vérifier la quantité de protéine marquée à la digestion. À remarquer que la capacité de Glutathione Sepharose 4B pour la GST est d'au moins 5 mg/ml de milieu de chromatographie. Cependant le milieu n'est pas saturé en protéine marquée dans la plupart des purifications.

  Rapports :

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

PreScission Protease	Au moins 10 unités/mg de protéine marquée
Thrombine	Au moins 10 unités/mg de protéine marquée. Une unité de clivage de la thrombine de GE digère ≥ 90 % de 100 µg d'une protéine de test marquée au bout de 16 heures à + 22 °C.
Facteur Xa	Au moins 1 % (w/w) de protéine marquée. Pour certaines protéines marquées, il est possible d'utiliser jusqu'à 5 % de facteur Xa. La quantité optimale doit être déterminée de manière empirique. Dans certains cas, une concentration de protéine marquée de 1 mg/ml s'est avérée efficace pour obtenir des résultats optimaux. Ajouter ≤ 0,5 % de SDS (w/v) au tampon de réaction peut améliorer de manière significative le clivage du facteur Xa avec certaines protéines marquées. Il est indispensable de tester de nombreuses concentrations en SDS afin de trouver la concentration optimale.

- **Augmenter le temps d'incubation et de concentration enzymatique :** Pour PreScission Protease, la thrombine ou le facteur Xa, augmenter le temps de réaction de 20 heures ou plus, si la protéine marquée n'est pas dégradée par une incubation importante. La quantité d'enzymes peut également être augmentée.
- **Vérifier la présence de sites de clivage spécifiques :** Vérifier la séquence ADN du produit de construction. Comparez-la à une séquence connue et vérifier que les différents sites de clivage spécifiques pour l'enzyme utilisée n'ont pas été modifiés lors du clonage de la protéine marquée.

S'assurer de l'absence des inhibiteurs de l'enzyme de clivage

- Effectuer un échange de tampon **PreScission Protease:** ou dialyser la protéine marquée contre du Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, pH 7,5 avant le clivage.
- **Facteur Xa :** Effectuer un échange de tampon sur HiTrap Desalting, une colonne PD-10 ou HiPrep 26/10 Desalting en fonction du volume de l'échantillon, ou dialyser contre du Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, $CaCl_2$ 1 mM, pH 7,5.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

- **Le facteur Xa n'est pas correctement activé :** Le facteur Xa fonctionnel nécessite l'activation du facteur X avec le venin de vipère de Russell. Les conditions d'activation correspondent à un rapport de venin de vipère de Russell au facteur Xa de 1% dans Tris-HCl 8 mM, NaCl 70 mM, $CaCl_2$8 mM, pH 8,0. Incuber à + 37 ° C pendant 5 min Le facteur Xa de GE a été préalablement activé par cette procédure
- **Le premier acide aminé après la séquence de reconnaissance du facteur Xa est Arg ou Pro :** Vérifier la séquence du partenaire marqué pour être sûr que les trois premiers nucléotides après la séquence de reconnaissance du facteur Xa ne codent pas pour Arg ou Pro.

Les bandes multiples sont observées après analyse par électrophorèse de la protéine cible clivée

- **Déterminer le moment où les bandes apparaissent :** Tester pour s'assurer que des bandes supplémentaires ne sont pas présentes avant le clivage de PreScission Protease, de la thrombine ou du facteur Xa. De telles bandes peuvent être le résultat d'une protéolyse dans les bactéries hôtes.
- **Le partenaire marqué peut contenir des séquences de reconnaissance de PreScission Protease, de la thrombine ou du facteur Xa :** Vérifiez les séquences. Voir le *GST Gene Fusion System Handbook* (voir la section *Informations de commande*) pour plus de détails.

Informations supplémentaires

Consulter le *GST Gene Fusion System Handbook* pour de plus amples informations et instructions pGEX concernant les consignes de dépannage pour l'expression, la fermentation et la solubilisation.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

10 Informations de commande

Produit	Quantité	Code n°
Glutathione Sepharose 4B	10 ml	17-0756-01
	100 ml	17-0756-05
	300 ml	17-0756-04

Produits connexes	Quantité	Code n°
GSTrap 4B	1 × 1 ml	29-0486-09
	5 × 1 ml	28-4017-45
	100 × 1 ml [1]	28-4017-46
	1 × 5 ml	28-4017-47
	5 × 5 ml	28-4017-48
	100 × 5 ml [1]	28-4017-49
GST SpinTrap Purificaton Module	50 × 50 µl	27-4570-03
GST MultiTrap 4B	4 plaques × 96 puits	28-4055-00
HiTrap Desalting	5 × 5 ml	17-1408-01
Colonne PD-10 Disposable	30	17-0851-01
HiPrep 26/10 Desalting	1 × 53 ml	17-5087-01
GST Detection Module	50 réactions	27-4590-01
GST 96-well Detection module	5 plaques	27-4592-01
Anticorps Anti-GST	0,5 ml	27-4577-01

[1] Disponible sur commande spécifique du client

Protéases spécifiques au site	Quantité	Code n°
PreScission Protease	500 unités	27-0843-01
Thrombine	500 unités	27-0846-01
Facteur Xa	400 unités	27-0849-01

Références associées	Quantité	N° code
GST Gene Fusion System Handbook	1	18-1157-58
Recombinant Protein Purification Handbook	1	18-1142-05
Glutathione Sepharose - Total solutions for preparation of GST-tagged proteins Selection Guide	1	28-9168-33
Pure simplicity for tagged proteins Brochure	1	28-9353-64

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Pour les coordonnées des bureaux locaux, consulter
www.gelifesciences.com/contact

GE Healthcare UK Limited
Amersham Place
Little Chalfont
Buckinghamshire, HP7 9NA
Royaume-Uni

www.gelifesciences.com/protein-purification

GE et le monogramme GE sont des marques déposées de General Electric Company.

GSTrap, HiTrap, Sepharose, HiPrep, Tricorn et PreScission sont des marques de commerce de General Electric Company ou de l'une de ses filiales.

Pefabloc est une marque de commerce de Pentapharm Ltd..

Toutes les autres marques commerciales tierces sont la propriété de leur propriétaire respectif.

© 2006-2014 General Electric Company – Tous droits réservés.
Première publication en 2006

Tous les produits et services sont vendus conformément aux conditions générales de vente de la société au sein de GE Healthcare qui les fournit. Une copie de ces conditions générales est disponible sur demande. Contacter un représentant GE Healthcare local pour obtenir les informations les plus récentes.

Les vecteurs pGEX doivent être utilisés pour des recherches scientifiques et dans aucun autre objectif, et une licence pour utilisation commerciale des produits sous licence et des processus couverts par le brevet 5,654,176 des États-Unis, les brevets équivalents et demandes de brevets dans d'autres pays doit être négociée directement par l'acheteur avec Millipore Corp (anciennement Chemicon International Inc) avant une telle utilisation.

GE Healthcare Bio-Sciences AB
Björkgatan 30, 751 84 Uppsala, Sweden

GE Healthcare Europe GmbH
Munzinger Strasse 5, D-79111 Freiburg, Germany

GE Healthcare Bio-Sciences Corp.
800 Centennial Avenue, P.O. Box 1327, Piscataway, NJ 08855-1327, USA

GE Healthcare Japan Corporation
Sanken Bldg. 3-25-1, Hyakunincho Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

52-2303-00 AL 12/2014 a2069

DOMINIQUE DUTSCHER SAS