



Glutathione Beads 4FF

高速GST标签蛋白纯化（琼脂糖凝胶）

Cat. No. CW8215

产品简介

Glutathione Beads 4FF 可以纯化各种表达系统表达的谷胱甘肽-S-转移酶、谷胱甘肽依赖性蛋白和谷胱甘肽转移酶的重组衍生物。Glutathione Beads 4FF是以4%琼脂糖凝胶为基质，通过12个原子的间隔臂，用化学方法共价结合了还原型谷胱甘肽制作而成。Glutathione Beads 4FF 因其耐压的基质，可以在相对较高的流速下，实现对目的蛋白的纯化，更适合用于较大规模蛋白的纯化。

保存条件

2-8℃保存

产品内容

Component	CW8215M 10 mL
Glutathione Beads 4FF	10 mL

产品参数

项目	性能
基质	高度交联的4%琼脂糖凝胶
配体	通过12原子间隔臂偶联的谷胱甘肽
综合能力	> 10 mg GST蛋白（40 kDa）/mL 基质
粒径	45-165 μm
最大压力	0.3 MPa, 3 bar
pH稳定范围	3-12
储存缓冲液	含20%乙醇的1×PBS

注意事项

- 1. 请勿冷冻保存本产品。
- 2. 使用前一定要充分颠倒若干次, 使琼脂糖珠混合均匀。
- 3. 本产品仅限科研使用。

操作步骤

一、缓冲液准备

缓冲液在使用之前建议用0.22 μm或0.45 μm滤膜过滤。
平衡/洗杂液: 140 mMNaCl, 2.7 mMKCl, 10 mMN₂HPO₄, 1.8 mMKH₂PO₄, pH7.4
洗脱液: 用平衡液配制10 mM 还原型谷胱甘肽 (现配现用)
注意: 平衡液和洗脱液中可加入1-10 mM DTT。

二、样品准备

样品在上样前建议离心或用0.22 μm或0.45 μm滤膜过滤, 减少杂质, 提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

- 1. 细菌或酵母表达的蛋白
 - 1.1 挑取单菌落到培养基中, 根据载体使用说明, 加入相应浓度的诱导剂诱导相应的时间。
 - 1.2 表达结束后, 将培养液转移到离心瓶中, 7,000 rpm (7,500×g), 离心15 min 收集菌体, 然后按照菌体: 平衡液=1: 10 (W/V) 加入平衡液, 加入终浓度为1 mM的PMSF (PMSF在破碎前加入, 其终浓度为1 mM), 同时也可加入其他蛋白酶抑制剂, 但不能影响目的蛋白与填料的结合。
 - 1.3 加入溶菌酶 (工作浓度为1 mg/mL, 如果表达的宿主细胞内含pLysS或pLysE, 可以不加溶菌酶)。
 - 1.4 将菌体沉淀悬浮起来, (如果菌液浓度高, 也可考虑加入10 μg/mL RNaseA和5 μg/mL DNaseI), 混匀, 放置于冰上, 然后冰上超声破碎细胞, 至菌液基本保持澄清。

1.5 将澄清的破碎液转移至离心管中, 10,000rpm(15,000×g), 4℃离心20-30min。取上清, 置于冰上备用或-20℃保存。

2. 酵母、昆虫和哺乳细胞分泌表达可溶性蛋白

2.1 将细胞培养液转移至离心瓶, 5,000 rpm(3,800×g), 离心10 min, 收集上清, 即可直接上柱纯化。

注意: 对于大量体积的上清, 需加入硫酸铵沉淀浓缩后, 蛋白还需用平衡液透析后才能上柱。

3. 层析柱的装填

3.1 Glutathione Beads 4FF 重力柱的装填

- 1) 取合适规格的重力层析柱, 装入下垫片, 加入适量纯水润洗柱管和垫片, 关闭下出口。
- 2) 将Glutathione Beads 4FF混合均匀, 用枪头吸取适量浆液加入至重力柱中(介质实际体积占悬液的一半), 打开下出口流干保护液。
- 3) 加入适量纯水冲洗介质, 待柱管中液体重力流干后, 关闭下出口。
- 4) 装入润洗后的上垫片, 确保垫片与填料之前没有空隙, 且保持水平。
- 5) 装填好的重力柱可以直接加入平衡液进行平衡, 暂不使用时则加入保护液, 2-8℃保存。

3.2 中压层析柱的装填

Glutathione Beads4FF 用于大规模蛋白纯化时, 涉及到各种中压色谱层析柱的填装, 以下为 Gutathione Beads 4FF 填装层析柱的方法。

装柱前根据层析柱直径计算柱子底面积, 根据所需装柱高度计算所需介质体积, 公式如下:

$$V=1.15\pi r^2 \cdot h$$

V:所需介质体积 ml 1.15:压缩系数 r:柱管半径 cm h:装填高度 cm

注意:所取悬液体积应为介质体积的两倍, 因为介质体积只占悬液总体积的一半, 另一半为保护液。

- 1)用去离子水冲洗层析柱底筛板与接头, 确保柱底筛板上无气泡, 关闭柱底出口, 并在柱底部留出 1-2 cm 的去离子水。
- 2)将介质悬浮起来, 小心的将浆液连续地倒入层析柱中。用玻璃棒沿着柱壁倒入浆液可减少气泡的产生。
- 3)如果使用储液器, 应立即在层析柱和储液器中加满水, 将进样分配器放置于浆液表面, 连接至泵上, 避免在分配器或进样管中产生气泡。
- 4)打开层析柱底部出口, 开启泵, 使其在设定的流速下进行。最初应让缓冲液缓慢流过层析柱, 然后缓慢增加至最终流速, 这样可避免液压对所形成柱床的冲击, 也可以避免柱床形成的不均匀。如果达不到推荐的压力或流速, 可以用你所使用泵的最大流速, 这样也可以得到一个很好的装填效果。(注意:在随后的色谱程序中, 不要超过最大装柱流速的 75%)当柱床高度稳定后, 在最后的装柱流速下至少再上3 倍柱床体积的去离子水。标上柱床高度。
- 5)关闭泵, 关闭层析柱出口。
- 6)如果使用储液器, 去除储液器, 将分配器置于层析柱中。
- 7)将分配器推向柱子至标记的柱床高度处。允许装柱液进入分配器, 锁紧分配器接头。
- 8)将装填好的层析柱连接至泵或色谱系统中, 开始平衡。如果需要可以重新调整分配器。

4. 样品纯化

4.1 孵育法纯化

- 1) 根据纯化的样品量, 取适量Glutathione Beads 4FF加入离心管中, 1000 rpm离心1 min, 吸弃上清; 也可加入重力柱中, 流干保护液。
- 2) 向离心管中加入5倍介质体积的平衡液清洗介质, 1000 rpm离心1 min, 吸弃上清; 如使用重力柱, 则直接在重力柱中清洗, 直接重力流干平衡液; 重复两次以上。
- 3) 加入样品, 封闭离心管或重力柱管, 4℃振荡孵育2-4 h或者37℃孵育30 min-2 h。
- 4) 孵育结束后, 1000 rpm离心1 min, 吸弃上清, 或过滤收集介质, 上清保留作为流穿, 用于电泳鉴定。
- 5) 用5倍介质体积的洗杂液清洗介质, 1000 rpm离心1 min或重力柱管过滤, 去除上清 (注意不要吸到介质), 重复3-5次, 中间建议更换新离心管。
- 6) 加入3-5倍柱体积的洗脱液进行洗脱, 室温孵育5 min, 1000 rpm离心1 min或重力柱管收集洗脱液, 可重复2-3次。

4.2 重力柱法纯化

- 1) 将装填好的Glutathione Beads 4FF重力柱用5倍柱体积平衡液进行平衡, 使填料处于与目的蛋白相同的缓冲液体系下, 重复2-3次。
- 2) 将样品加到平衡好的重力柱中, 样品保留时间至少2min, 保证样品和介质充分接触, 收集流出液, 可以反复上样增加结合效率。
- 3) 用10-15倍柱体积的洗杂液进行洗杂, 去除非特异性吸附的杂蛋白, 收集洗杂液。
- 4) 使用5-10倍柱体积的洗脱液洗脱, 分段收集, 每一个柱体积收集一管, 分别检测, 既可以保证所有结合的目的蛋白被洗脱, 又可以得到高纯度和高浓度的蛋白。

4.3 中压层析柱法纯化

Glutathione Beads 4FF 装填好后, 可以用各种常规的中低压色谱系统。

- 1) 将泵管道中注满去离子水。去掉上塞子, 将层析柱连接至色谱系统中, 打开下出口, 将预装柱接到色谱系统中, 并旋紧。
- 2) 用3-5倍柱体积的去离子水冲洗出储存缓冲液。
- 3) 使用至少5倍柱床体积的平衡液平衡色谱柱。
- 4) 利用泵或样品环上样。注:样品的粘度增加使得即使上样体积很少, 也会导致层析柱很大的反压。上样量不要超过柱子的结合能力。大量的样品体积也可能造成很大的反压, 使得进样器更难使用。
- 5) 用洗杂液冲洗柱子, 直到紫外吸收达到一个稳定的基线(一般至少 10-15 个柱体积)。
- 6) 使用 5-10 倍柱体积的洗脱液洗脱, 收集洗脱液, 即目的蛋白组分。

注意: 上述步骤洗脱结束后, 用平衡液冲洗3倍柱体积, 然后用纯水冲洗5倍柱体积, 5倍柱体积的20%乙醇平衡填料, 最后将填料保存在20%乙醇的1×PBS中, 置于4℃保存。

5. SDS-PAGE 检测

将使用纯化产品得到的样品（包括流出组分、洗杂组分和洗脱组分）以及原始样品使用 SDS-PAGE检测纯化效果。

三、填料清洗

GST标签蛋白纯化产品可以重复使用而无需再生,但随着非特异性结合的蛋白的增多和蛋白的聚集,往往造成流速和结合载量性能下降,这时需要对填料进行清洗。

去除一些沉淀或变性物质, 建议使用下面的方法

用2倍柱体积的6M盐酸胍溶液进行清洗, 然后立即用5倍柱体积的PBS, pH7.4清洗。

去除一些疏水性吸附造成的非特异性吸附物质

用3-4倍柱体积的70%乙醇或2倍柱体积的1%TritonX-100清洗, 然后立即用5倍柱体积的PBS, pH7.4清洗。

问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
柱子反压过高	填料被堵塞	按照第3部分进行填料清洗。 裂解液中含有微小的固体颗粒, 建议上柱前使用滤膜(0.22 μm或0.45 μm)过滤, 或者离心去除。
	样品太粘稠	样品中含有高浓度的核酸, 加长破碎时间直至粘度降低, 或者添加DNaseI (终浓度5 μg/ml), Mg ²⁺ (终浓度1 mM), 冰上孵育10-15分钟。
	缓冲液太粘稠	有机溶剂或者蛋白稳定试剂(如甘油等)可能会引起反压增高, 降低操作流速。
洗脱组分中没有目的蛋白	GST标签蛋白变性了	使用温和的裂解条件。
	过度裂解使目的蛋白变性	
	目的蛋白聚集产生了沉淀	在细胞裂解前溶液中加入DTT, 终浓度为1-20 mM。
	融合蛋白改变了GST的构象, 影响了目的蛋白的结合力	测定pGEX中GST的结合力, 对载体进行超声处理, 检测其结合力。如果载体中GST有很高的亲和力, 有可能改变融合蛋白的构象从而降低了GST标签蛋白的亲和力。
	柱子平衡时间太短, 目的蛋白不是在pH6.5-pH8范围内结合的	用pH6.5-pH8.0的Buffer进行充分的平衡(例如PBS)。
目的蛋白没有完全洗脱下来	洗脱体积太少	增加洗脱液体积, 减小洗脱流速。
	洗脱液中谷胱甘肽浓度太低	增加洗脱液中谷胱甘肽浓度, 可尝试用50mMTris-HCl, 20-40 mM还原型谷胱甘肽,pH8.0洗脱。
	低pH影响洗脱	在不增加洗脱液中的谷胱甘肽量时, 提高洗脱液中pH至pH8-9会有改善。
		增加洗脱液中离子强度, 如0.1-0.2MNaCl。
	洗脱液中的谷胱甘肽被氧化	使用新鲜配制的洗脱液。
		加入DTT。
	非特异性疏水作用影响目的蛋白的溶解与洗脱	洗脱液中加入非离子型洗涤剂, 如0.1%的TritonX-100或者2%正辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷Tween-20。

电泳或 Western Blot检测中发现多条带	Mr70000蛋白与目的蛋白一起被纯化出来	Mr70000的蛋白有可能是大肠杆菌基因DnaK的产物, 可以通过在目的蛋白中加入50mM Tris-HCl, 2mM ATP, 10mM MgSO ₄ , pH7.4在37°C加热10分钟去除。
		可以通过ATP-琼脂糖胶或离子交换来去除目的蛋白溶液中的DnaK蛋白。
	GST融合蛋白已经发生降解	在裂解液中加入蛋白酶抑制剂, 如加入1mM PMSF。
		可能是蛋白酶对目的蛋白部分降解造成的, 可以使用蛋白酶缺陷型宿主菌(如lon-或ompT)。
	细胞破碎过度	减少细胞破碎时间, 超声前加入溶菌酶(菌液体积的0.1倍的10mg/ml溶菌酶, 25mM Tris-HCl, pH8.0), 避免发泡导致蛋白变性, 过度超声破碎增加宿主内源蛋白与GST融合目的蛋白的共纯化。
	融合蛋白改变了GST的构象, 影响了目的蛋白的结合力	测定pGEX中GST的结合力, 对载体进行超声处理, 检测其结合力。如果载体中GST有很高的亲和力, 有可能改变融合蛋白的构象从而降低了GST标签蛋白的亲和力。
	共价共纯化	包括促进蛋白正确折叠的分子伴侣的共纯化, 如: DnaK(Mr~70000), DnaJ(Mr~37000), GrpE(Mr~40000), GroEL(Mr~57000)和GroES(Mr~10000)。可再进行一次纯化可以改善。
	抗体与E.coli的各种蛋白反应	抗体吸附E.coli蛋白: GST-抗体。超声处理去除GST抗体, 可以用Western Blot检测。