



# Glutathione Beads

## 目录

|                   |   |
|-------------------|---|
| 1. 产品介绍.....      | 1 |
| 2. 纯化流程.....      | 1 |
| 3. 填料清洗.....      | 2 |
| 4. 问题及解决方案.....   | 2 |
| 5. 订购信息及相关产品..... | 3 |

## 1. 产品介绍

**Glutathione Beads** 可以一步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** 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。这种特别设计使填料的纯化效率得到了提高，因此填料载量大于 20 mg GST 融合蛋白。**Glutathione Beads** 具有载量高、特异性好、性价比高的特点。

表 1. Glutathione Beads 产品性能

| 项目      | 性能                          |
|---------|-----------------------------|
| 基质      | 4% 琼脂糖凝胶                    |
| 配体      | 通过 12 原子间隔臂偶联的谷胱甘肽          |
| 载量      | >20 mg GST 蛋白(40 kDa)/ml 基质 |
| 微球粒径    | 45–165 $\mu\text{m}$        |
| 最大压力    | 0.1 MPa, 1 bar              |
| pH 稳定范围 | 3–12                        |
| 储存缓冲液   | 含 20% 乙醇的 1XPBS             |
| 储存温度    | 2–8 $^{\circ}\text{C}$      |

## 2. 纯化流程

### 2.1 缓冲液的准备

缓冲液在使用前最好用 0.22  $\mu\text{m}$  或者 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤。

平衡/洗杂液：140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4

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。

### 2.2 样品准备

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

#### 2.2.1 细菌或酵母表达的蛋白

- 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。
- 2) 表达结束后，将培养液转移到离心杯中，7,000 rpm(7,500 $\times$ 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。加入溶菌酶（工作浓度为 0.2–0.4 mg/ml，如果表达的宿主细胞内含 pLysS 或 pLysE，可以不加溶菌酶），（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）。
- 3) 将菌体沉淀悬浮起来，（如果菌液浓度高，也可考虑加入 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNase A 和 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DNase I），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。
- 4) 将澄清的破碎液转移至离心管中，10,000 rpm(15,000 $\times$ g)，4 $^{\circ}\text{C}$  离心 20–30 min。取上清，置于冰上备用或 -20 $^{\circ}\text{C}$  保存。

#### 2.2.2 酵母、昆虫和哺乳细胞分泌表达可溶性蛋白

- 1) 将细胞培养液转移至离心杯，5,000 rpm(3,800 $\times$ g)，离心 10 min，收集菌体得上清，即可直接加入柱子使用。
- 2) 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加入柱子。

### 2.3 Glutathione Beads 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** 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。

## 2.4 样品纯化

### 2.4.1 孵育法纯化

- 1) 根据纯化的样品量, 取适量 **Glutathione Beads** 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 5min, 1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管收集洗脱液, 可重复 2-3 次。

### 2.4.2 重力柱法纯化

- 1) 将装填好的 **Glutathione Beads** 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 2 min, 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。

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, 再用保护液冲洗 2 个柱体积, 然后将介质置于 2-8℃保存。

## 2.5 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。

## 3. 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 6 M 盐酸胍溶液进行清洗, 然后立即用 5 倍柱体积的 PBS, pH 7.4 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% Triton X-100 清洗, 然后立即用 5 倍柱体积的 PBS, pH 7.4 清洗。

## 4. 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。<br>裂解液中含有微小的固体颗粒, 建议上柱前使用滤膜 (0.22μm或0.45μm) 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DNase I (终浓度 5 μg/ml), Mg <sup>2+</sup> (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, 实验条件以经验为准。                                                                                   |
|             | 过度的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。<br>降低结合温度至+4℃, 充分地清洗。 |
|             | 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 pH 6.5 -pH 8.0的Buffer进行充分的平衡 (例如PBS)。                                                                 |





(续表)

| 问题                      | 原因分析                       | 推荐解决方案                                                                                                                                      |
|-------------------------|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 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50 mM Tris-HCl, 20–40 mM还原型谷胱甘肽, pH 8.0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pH 8–9 会有改善。                                                                                                      |
|                         |                            | 增加洗脱液中离子强度, 如0.1–0.2 M NaCl。                                                                                                                |
|                         | 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。                                                                                                                                     |
| 电泳或western blot检测中发现多条带 | 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Triton X-100 或者2%正辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷Tween-20。                                                                               |
|                         | Mr 70 000 蛋白与目的蛋白一起被纯化出来   | Mr 70 000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50 mM Tris-HCl, 2 mM ATP, 10 mM MgSO <sub>4</sub> , pH 7.4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1 mM PMSF。                                                                                                                |
|                         |                            | 有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 10 mg/ml溶菌酶, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0), 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 融合蛋白的共纯化。                                |
|                         | 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 ~ 70 000), DnaJ (Mr ~ 37 000), GrpE (Mr ~ 40 000), GroEL (Mr ~ 57 000) 和 GroES (Mr ~ 10 000)。可再进行一次纯化可以改善。 |
|                         | 抗体与 <i>E. coli</i> 的各种蛋白反应 | 抗体吸附 <i>E. coli</i> 蛋白: GST-抗体。 超声处理去除GST抗体, 可以用Western Blots 检测。                                                                           |

## 5. 订购信息及相关产品

| 名称                     | 货号       | 规格            |
|------------------------|----------|---------------|
| Glutathione Beads      | SA008005 | 5 ml          |
|                        | SA008025 | 25 ml         |
|                        | SA008100 | 100 ml        |
|                        | SA008500 | 500 ml        |
|                        | SA00801L | 1 L           |
|                        | SA00810L | 10 L          |
| GSTPur Glutathione Kit | SA008K03 | 3 次           |
|                        | SA008K05 | 5 次           |
| Glutathione Beads 4FF  | SA010005 | 5 ml          |
|                        | SA010025 | 25 ml         |
|                        | SA010100 | 100 ml        |
|                        | SA010500 | 500 ml        |
|                        | SA01001L | 1 L           |
|                        | SA01010L | 10 L          |
| GSTCap 4FF             | SA010C11 | 1X1 ml        |
|                        | SA010C51 | 5x1 ml        |
|                        | SA010C15 | 1X5 ml        |
|                        | SA010C55 | 5X5 ml        |
|                        | SA010CS  | 3X1 ml+1X5 ml |

