



Glutathione Beads 4FF 重力柱

目录

1. 产品介绍.....	1
2. 纯化流程.....	1
3. 在位清洗.....	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 4FF 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 4FF 是以高度交联的 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，更适合用于工业大规模蛋白的纯化。具体性能见表 1。

Glutathione Beads 4FF 重力柱以 Glutathione Beads 4FF 为装填材料，提供 1 ml 和 5 ml 两种规格产品，方便客户使用，操作简单，纯化效率高。

表 1. Glutathione Beads 4FF 产品性能

项目	性能
基质	高度交联的 4%琼脂糖微球
配体	通过 12 原子间隔臂偶联的谷胱甘肽
载量	> 10 mg GST 标签蛋白 (40kDa) /ml 基质
微球粒径	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
储存温度	2-8 $^{\circ}\text{C}$

2. 纯化流程

2.1 缓冲液的准备

所用水和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 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , pH 7.4

洗脱液: 50 mM Tris, 10 mM 还原型谷胱甘肽, pH 8.0

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 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。

2.3 样品纯化

Glutathione Beads 4FF 重力柱使用请参考以下说明，各溶液用量均按照柱体积计算（例如：2 个柱体积，1 ml 规格对应为 2 ml 溶液，5 ml 规格对应为 10 ml 溶液）。整个纯化流程大约需要 30 min（主要取决于样品体积和溶液的粘稠性），操作快捷。使用流程请参考图 1。

- 1) 将 Glutathione Beads 4FF 重力柱固定在铁架台上，依次去掉下端塞和上端塞，流干重力柱的保护液。
- 2) 向柱管中加入 5 个柱体积的平衡液，进行平衡，使填料处于与目的蛋白相同的缓冲体系下，起到保护蛋白的作用。
- 3) 将样品加到平衡好的重力柱中，样品保留时间至少 2 min，保证目的蛋白与介质充分接触，提高目的蛋白的回收率。收集流出液，用于 SDS-PAGE 分析蛋白质的结合情况，在出现问题时，更方便寻找解决问题的方案。
- 4) 用 10-15 倍柱体积的洗杂液进行清洗，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液。
- 5) 使用 5-10 倍柱体积的洗脱液进行目的蛋白的洗脱，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。
- 6) 依次使用 3 倍柱体积的平衡液和 5 倍柱体积的去离子水平衡填料。将重力柱保存在等体积的 20%乙醇中，置于 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存，防止填料被细菌污染。



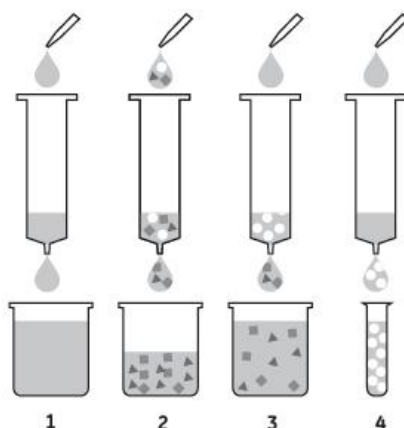


图 1. 使用 Glutathione Beads 4FF 重力柱纯化蛋白流程示意图

Step 1: 柱子平衡; Step 2: 上样; Step 3: 洗杂; Step 4: 洗脱

2.4 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. 在位清洗

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，这时需要对介质进行清洗。

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部分进行介质清洗。 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DNase I（终浓度5 μg/ml），Mg ²⁺ （终浓度 1 mM），冰上孵育10-15 min。
	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	过度的裂解使目的蛋白变性，使用温和的裂解条件，实验条件以经验为准。
	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。 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的缓冲液进行充分的平衡（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50 mM Tris，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。
	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。



(续表)

问题	原因分析	推荐解决方案
电泳或western blot检测中发现多条带	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, 2 mM ATP, 10 mM MgSO ₄ , pH 7.4在37°C加热10 min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, 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融合目的蛋白的共纯化。
	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 重力柱	SA008GC01	1 ml
	SA008GC05	5 ml
Glutathione Beads 4FF 重力柱	SA010GC01	1 ml
	SA010GC05	5 ml

