



# HiSelect Glutathione 4FF

## 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 4FF 可以纯化各种表达系统融合表达的谷胱甘肽-S-转移酶的目的蛋白、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，因其耐压的基质，该产品可以用于工业大规模蛋白的纯化，可以在相对较高的流速下，实现对目的蛋白的纯化。Glutathione Beads 4FF 可以耐受最高 0.3 MPa 的压力，更稳定。具体性能见表 1。

**HiSelect Glutathione 4FF** 是一种中压预装柱，灌装 4.7 ml 的 **Glutathione Beads 4FF** 介质。柱管由生物相容性聚丙烯制成，不与生物分子相互作用。柱管两头都有堵头，防止保护液的泄露。柱体标签上的箭头表示推荐的流向。预装柱具有标准接口，可以适配商品化的各类中压色谱系统，如 ÄKTA 等，方便客户操作。

表 1. HiSelect Glutathione 4FF 产品性能

项目	性能
规格	4.7 ml
基质	高度交联 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	>10 mg GST 蛋白(40 kDa)/ml 基质
粒径	45-165 μm
耐压	0.3 MPa, 3 bar
pH 稳定范围	3-12
柱尺寸 (内径×高度)	0.77×10 cm
储存缓冲液	含 20%乙醇的 1×PBS
储存温度	2-8℃

## 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 μm 或者 0.45 μm 滤膜过滤。

平衡/洗杂液: 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 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 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。

#### 2.2.1 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×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 μg/ml RNase A 和 5 μg/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×g)，4℃离心 20-30 min。取上清，置于冰上备用或-20℃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×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 样品纯化

**HiSelect Glutathione 4FF** 是一种用于 GST 标签蛋白纯化的预装柱产品，可用于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，将层析柱连接至色谱系统中。再打开下口，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存储缓冲液。
- 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) 用洗脱液采用一步法或线性梯度洗脱。一步洗脱中，通常 5 倍柱体积洗脱液就足够了。梯度洗脱可以用一个小的梯度，例如 20 倍柱体积或更多，来分离不同结合强度的蛋白质。
- 7) 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，最后再用 5 倍柱体积的含 20%乙醇的 1×PBS 平衡，然后将预装柱置于 2-8℃保存，防止填料被细菌污染。

### 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. 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。 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 <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。 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pH 6.5-pH 8.0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）。
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。



(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。
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-HCl, 2 mM ATP, 10 mM MgSO <sub>4</sub> , pH 7.4在37℃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 Blot检测。

## 5. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
HiSelect Glutathione 4FF	SA010C47	1×4.7 ml
HiPur Glutathione 4FF	SA010C20	1×20 ml