



Glutathione Beads 4FF

目录

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

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。

表 1. Glutathione Beads 4FF 产品性能

项目	性能
基质	高度交联的 4%琼脂糖凝胶
配体	通过 12 原子间隔臂偶连的谷胱甘肽
载量	> 10 mg GST-tagged protein(40 kDa) /ml 介质
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 °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 μm 或者 0.45 μm 滤膜过滤。

平衡/洗杂液: 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 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°C 离心 20-30 min。取上清，置于冰上备用或-20°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×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 层析柱的装填

2.3.1 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。

2.3.2 中压层析柱的装填

Glutathione Beads 4FF 被广泛应用于工业纯化，因此，涉及到各种中压色谱层析柱的装填，下面介绍 **Glutathione Beads 4FF** 装填层析柱的方法。

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：

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

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。

2.4 样品纯化流程

2.4.1 孵育法纯化

- 1) 根据纯化样品量，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 10-15 min，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 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 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。

2.4.3 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。



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°C 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 部分对填料进行在位清洗。 裂解液中含有微小的固体颗粒，建议上柱前使用滤膜（0.22 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	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°C，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 的溶液进行充分的平衡（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。
	洗脱液中还原型谷胱甘肽浓度太低	增加洗脱液中还原型谷胱甘肽浓度，可尝试用 20-40 mM 还原型谷胱甘肽洗脱。
	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。
	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。
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 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-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 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 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