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. 其他产品.....4

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。这种特别设计使树脂的纯化效率得到了提高，因此树脂载量大于 20mg 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（/ml 基质）	>20 mg GST 蛋白(40 kDa)
微球粒径（μm）	45–165
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°C-8°C

2. 纯化流程

2.1 Buffer 的准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22μm 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-HCl, 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 0.22μm 或 0.45μm 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

1) 将 **Glutathione Beads** 装入合适的层析柱，用 5 倍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。

2) 将样品加到平衡好的 **Glutathione Beads** 中，保证目的蛋白与 **Glutathione Beads** 充分接触，提高目的蛋白的回收率，收集流出液。

3) 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。

4) 使用 5-10 倍柱体积的洗脱液，收集洗脱液，即目的蛋白组分。

5) 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，然后保存在等体积的 20%的乙醇中，置于 2-8 度保存，防止填料被细菌污染。

2.4 纯度检测

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，这时需要对树脂进行清洗。

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, 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部分进行树脂清洗。
		裂解液中含有微小的固体颗粒，建议上柱前使用滤膜（0.22μm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^{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，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	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

	合力	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。
	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 $MgSO_4$, 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. 其他产品

A10001	Protein A/G-Agarose
A10002	Protein A/G-MagPoly
A10006	彩色预染蛋白Marker（11-180kDa）
A10013	SDS-PAGE快速染色液(2分钟显色)
M20012	Anti-Myc-Tag Mouse Antibody(Agarose Conjugated)
M20013	Anti-HA-Tag Mouse Antibody(Agarose Conjugated)
M20014	Anti-GFP-Tag Antibody (Agarose conjugated)
M20015	Anti-GFP Tag mAb Agarose conjugated （避重轻链特制款）
M20018	Anti-DYKDDDDK-Tag Mouse Antibody (Agarose Conjugated)
M20118	Anti-DYKDDDDK-Tag mAb (Magnetic Beads)