



Glutathione Beads

GST标签蛋白纯化（琼脂糖凝胶法）

Cat. No. CW8214

产品简介

Glutathione Beads 可以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。Glutathione Beads具有载量高、特异性好、性价比高的特点。

保存条件

2-8°C保存

产品内容

Component	CW8214M 10 mL
Glutathione Beads	10 mL

产品参数

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
综合能力	> 20 mg GST蛋白 (40 kDa) /mL 基质
粒径	45-165 μm
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1×PBS

注意事项

1. 请勿冷冻保存本产品。
2. 使用前一定要充分颠倒若干次, 使琼脂糖珠混合均匀。
3. 本产品仅限科研使用。

操作步骤

本操作流程主要为免疫沉淀反应, 每次反应使用 50 μL rProtein A/G MagPoly Beads 为例, 可根据需要适当的增加或减少磁珠使用量。

一、缓冲液准备

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 mMNaCl, 2.7 mMKCl, 10 mMN₂HPO₄, 1.8 mMKH₂PO₄, pH7.4

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。

二、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。

1. 细菌或酵母表达的蛋白

- 1.1 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。
- 1.2 表达结束后，将培养液转移到离心瓶中，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 (PMSF在破碎前加入，其终浓度为1 mM)，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。
- 1.3 加入溶菌酶 (工作浓度为1 mg/mL，如果表达的宿主细胞内含pLysS或pLysE，可以不加溶菌酶)。
- 1.4 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 RNaseA和5 μg/mL DNaseI)，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。
- 1.5 将澄清的破碎液转移至离心管中，10,000rpm(15,000×g)，4℃离心20-30min。取上清，置于冰上备用或-20℃保存。

2. 酵母、昆虫和哺乳细胞分泌表达可溶性蛋白

- 2.1 将细胞培养液转移至离心瓶，5,000 rpm(3,800×g)，离心10 min，收集上清，即可直接上柱纯化。

注意：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上柱。

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。

4. 样品纯化

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5 min, 1000 rpm离心1 min或重力柱管收集洗脱液, 可重复2-3次。

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2min, 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。

注意: 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, 5倍柱体积的20%乙醇平衡填料, 最后将填料保存在20%乙醇的1×PBS中, 置于4°C保存。

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。

三、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6M盐酸胍溶液进行清洗, 然后立即用5倍柱体积的PBS, pH7.4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%TritonX-100清洗, 然后立即用5倍柱体积的PBS, pH7.4清洗。

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DNaseI (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。
	过度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。
	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pH6.5-pH8.0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50mMTris-HCl, 20-40 mM还原型谷胱甘肽, pH8.0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pH8-9会有改善。
		增加洗脱液中离子强度, 如0.1-0.2MNaCl。
	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TritonX-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	Mr70000蛋白与目的蛋白一起被纯化出来	Mr70000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50mM Tris-HCl, 2mM ATP, 10mM MgSO ₄ , pH7.4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1mM PMSF。
		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10mg/ml溶菌酶, 25mM Tris-HCl, pH8.0), 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~70000), DnaJ(Mr~37000), GrpE(Mr~40000), GroEL(Mr~57000)和GroES(Mr~10000)。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 Blot检测。	