

GSTPur Glutathione kit

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 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。这种特别设计使介质的纯化效率得到了提高，因此介质载量大于 20 mg GST 融合蛋白，因此 Glutathione Beads 具有载量高，性价比高的特点。

GSTPur Glutathione Kit 提供 1 根填充 3 ml **Glutathione Beads** 的重力预装柱 (GSTPur Glutathione Column)，2 瓶 100 ml Lysis/Wash Buffer 的和 1 瓶 100 ml 的 Elution Buffer。不要再进行填料填充和缓冲液配制。方便客户使用，操作简单，纯化效率高。试剂盒详细组分见表 1。

表 1. GSTPur Glutathione Kit 组分

组分名称	货号	规格	数量
GSTPur Glutathione Column	SA008GC03	3 ml	1
GST-tag Lysis/Wash Buffer	SLB015100	100 ml	2
GST-tag Elution Buffer	SLB016100	100 ml	1

表 2. Glutathione Beads 产品性能

项目	性能
基质	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 (ml 介质)	> 20 mg GST 蛋白 (40 kDa)
粒径 (μm)	45-165
最大流速	0.1 MPa, 1 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°C - 8°C

2. 纯化流程

2.1 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 样品纯化

GSTPur Glutathione Kit 不要再进行填料填充和缓冲液配制，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。使用时参考下面操作说明。

- 1) 将 GSTPur Glutathione Column 固定在铁架台上，依次去掉下端塞和上端塞，流干预装柱的保护液。
- 2) 向柱管中加入 5 ml Lysis/Wash Buffer 平衡柱子，流干后，再重复 2 次，共使用 15 ml Lysis/Wash Buffer。
- 3) 将处理好的样品加入柱管，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) 向柱管中加入 5 ml Lysis/Wash Buffer，进行洗杂，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液，目的与收集流出液的目的相同，Lysis/Wash Buffer 流干后，再重复 5 次，共使用 30 ml Lysis/Wash Buffer。
- 5) 使用 15-30 ml 的 Elution Buffer 进行洗脱目的蛋白，分段收集，每 5 ml 收集一管，分别检测，这样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 5 ml Lysis/Wash Buffer 和 5ml 去离子水交替平衡填料，重复 2 次，最后再用 5 ml 20%的乙醇平衡填料，重复 1 次，然后保存在 20%的乙醇中，置于 2-8 °C 保存，防止填料被细菌污染。



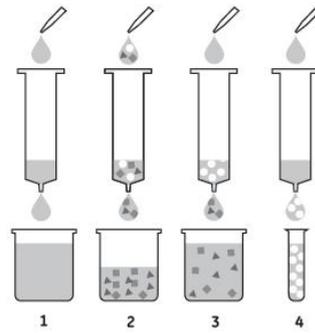


图 1. 使用 GSTPur Glutathione Column 纯化蛋白流程

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

2.3 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都下降，这时需要对介质进行清洗。

去除一些沉淀或变性物质

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，然后然后立即用 5 倍柱体积的 PBS，pH7.4 清洗。

4. 问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
柱子流速慢	填料被堵塞	按照第3部分进行介质清洗。 Lysis/Wash Buffer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分钟。
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°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Lysis/Wash Buffer进行充分的平衡。
目的蛋白没有完全洗脱下来	洗脱体积太少	增加Elution Buffer体积，减小洗脱流速。
	Elution Buffer中的谷胱甘肽被氧化	在Elution Buffer中加入DTT。
	非特异性疏水作用影响目的蛋白的溶解与洗脱	Elution Buffer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 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。





(续表)

电泳或western blot检测中发现多条带	GST融合蛋白已经发生降解	在Lysis/Wash Buffer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 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

