



Glutathione Sepharose 4FF 预装柱说明书

货号：YA2431

规格：1*1mL / 1*5mL / 5*1mL / 3*1mL+1*5mL / 5*5mL

保存：2-8°C

产品说明：

Glutathione Sepharose 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 Sepharose 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 Sepharose 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。

表 1：介质性能参数

基质	高度交联的 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)	>10 mg GST 蛋白(40kDa)
粒径 (μm)	45-165
最大压力	0.3 MPa, 3 bar
pH 稳定范围	3-12
储存缓冲液	20%乙醇

纯化流程：

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 Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 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、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。

3、样品纯化

1. 上柱：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。再折断下口，将预装柱接到色谱系统中，并旋紧。

2. 水洗：用 3-5 倍柱体积的去离子水冲洗出存储缓冲液。

3. 平衡：使用至少 5 倍柱床体积的平衡液平衡色谱柱。

4. 利用泵或注射器上样。

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. 洗杂：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. 洗脱：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。

7. 水洗：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 20% 的乙醇平衡，然后保存在等体积的 20% 的乙醇中，置于 4℃ 保存，防止填料被细菌污染。

4、SDS-PAGE 检测

将纯化过程中收集的样品（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。

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。

常见问题

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 5 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 (0.22 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。
	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。
	柱子平衡时间太短，目的蛋白不是在 pH6.5-pH8 范围内结合的	降低结合温度至 +4℃，充分地清洗。 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 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	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。