

GSTSep Glutathione Agarose Resin 4FF

谷胱甘肽高速纯化树脂（用于 GST 标签蛋白纯化）

产品简介

GSTSep Glutathione Agarose Resin 4FF 是一种 GST 标签蛋白纯化树脂，结构上是以高度交联的 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还原型谷胱甘肽制作而成，具有更高的物理化学特性，可以耐受更高的压力，在相对较高的流速下，实现对目的蛋白的纯化，更适于工业大规模蛋白的纯化。

此外，本品特异性好，性价比高，可以一步纯化各种表达系统中谷胱甘肽-S-转移酶、谷胱甘肽依赖性蛋白和谷胱甘肽重组衍生物。

产品信息

货号	20508ES10/20508ES50/20508ES60/20508ES80
规格	10 mL /50 mL /100 mL/1000 mL

产品性质

基质 (Matrix)	高度交联的 4%琼脂糖微球
配体 (Ligand)	通过 12 原子间隔臂偶联的谷胱甘肽
粒径 (Bead size)	45-165 μm
载量 (Capacity)	>10 mg GST 蛋白 (40 kDa) /mL 基质
最大压力 (Pressure _{Max})	0.3 MPa, 3 bar
pH 稳定范围 (pH range)	3-12
储存缓冲液 (Buffer)	含 20%乙醇的 1×PBS

储存条件

2~8°C 保存，有效期 2 年。

需准备试剂

所用水和 Buffer 在使用前最好用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤除菌。

平衡/洗杂缓冲液：140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4

洗脱缓冲液：用平衡液配制 10 mM 还原型谷胱甘肽（现配现用）

【注】平衡/洗杂缓冲液或洗脱缓冲液中可加入 1-10 mM DTT。

使用说明

【注】样品在上样前最好用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤，减少杂质以防阻塞柱子。

1. GSTSep Glutathione Agarose Resin 4FF 的装填（适用于各种中压色谱层析柱的装填）

- 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) 将树脂悬浮起来，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，开起泵，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，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】：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，将分配器至于层析柱中。
- 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. 样品纯化

- 1) **平衡**：用 5 倍柱体积的平衡 Buffer 平衡柱子，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) **上样**：Resin 平衡后，加入蛋白样品，使其与 Resin 充分接触，提高目的蛋白回收率，收集流出液。
- 3) **洗杂**：用 10-15 倍柱体积的洗杂缓冲液进行清洗，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液。
- 4) **洗脱**：使用 5-10 倍柱体积的洗脱缓冲液，收集洗脱液，即目的蛋白溶液。
- 5) **清洗与保存**：依次使用 3 倍柱体积的平衡 Buffer 和 5 倍柱体积的去离子水平衡填料，最后用 5 倍柱体积的 20%的乙醇平衡，然后保存在等体积的 20%乙醇中，置于 4°C 保存，防止填料被细菌污染。

3. SDS-PAGE 检测

将纯化过程中得到的样品（包括原始样品、流出组分、洗杂及洗脱组分等）利用 SDS-PAGE 进行检测，判定其纯化效果。

4. 填料清洗

GST 标签蛋白纯化产品可以重复使用而无需再生，但随着非特异结合蛋白的增多和蛋白的聚集，会造成流速和结合载量性能下降，此时需对填料进行清洗。

1) 去除一些沉淀或变形物质

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。

2) 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 1% Triton X-100 清洗，然后立即用 5 倍柱体积的 PBS，pH 7.4 清洗。

注意事项

1. 请勿冷冻保存本产品。
2. GSTSep Glutathione Agarose Resin 4FF 使用前一定要充分颠倒若干次，使琼脂糖珠混合均匀。
3. 所有操作过程中，样本需要在 4°C 或冰上操作。
4. 本产品仅作科研用途。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。

附表 问题及解决方案

问题	可能原因	推荐解决方案
柱子反压过高	填料被堵塞	清洗树脂
		裂解液中含有微小的固体颗粒，建议上样前最好用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤，或离心去除

	样品太黏稠	样品中含高浓度的核酸，延长破碎时间直至粘度降低，或添加 DNaseI（终浓度为 5 μg/mL），Mg ²⁺ （终浓度 1 mM），冰上孵育 10-15 min
	缓冲液太黏稠	有机试剂或蛋白稳定试剂（如甘油等）可能会引起反压增高，降低操作流速
洗脱组分中无目的蛋白	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	
	目的蛋白聚集产生沉淀	在细胞裂解前溶液中加入 DTT，终浓度为 1-10 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，有可能是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，充分清洗
	柱子平衡时间太短，目的蛋白不是在 pH 6.5-pH 8.0 范围内结合	用 pH 6.5-pH 8.0 的 buffer 进行充分的平衡，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和洗脱	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 Tween-20	
电泳或 Western Blot 检测中发现多条带	Mr 70000 蛋白与目的蛋白一起纯化下来	Mr 70000 蛋白可能是大肠杆菌基因 DnaK 的产物，可以在目的蛋白中加入 50 mM Tris-HCl，2 mM ATP，10 mM MgSO ₄ ，pH 7.4 在 37°C加热 10min 去除 可通过 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 可能是蛋白酶对目的蛋白部分降解造成的，可使用蛋白酶缺陷型宿主菌（如 <i>lon</i> -或 <i>ompT</i> ）
	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 10 mg/mL 溶菌酶，25 mM Tris-HCl，pH 8.0），避免发泡导致蛋白酶变性，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），GroES（Mr~10000）
	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 Blot 检测