

# GSTSep Glutathione 4FF Chromatography Column, 1 mL

## GST 标签蛋白纯化预装柱, 1 mL

### 产品简介

GSTSep Glutathione Agarose Resin 4FF 是一种 GST 标签蛋白纯化树脂，可以一步纯化各种表达系统中谷胱甘肽-S-转氨酶、谷胱甘肽依赖性蛋白和谷胱甘肽重组衍生物。在结构上，该树脂是以高度交联的 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。

GSTSep Glutathione 4FF Chromatography Column, 1 mL 是装填了 GSTSep Glutathione Agarose Resin 4FF 的一种中压预装柱，规格 1 mL，预装柱具有标准接口，可以适配商品化的各类中压色谱系统，如 ÄKTA 等，方便客户操作。

### 产品信息

货号	20509ES03/20509ES08
规格	1 mL / 5 × 1 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 $\mu\text{m}$
载量 (Capacity)	>10 mg GST 蛋白 (40 kDa) /mL 基质
最大压力 (Pressure <sub>Max</sub> )	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  $\mu\text{m}$  或 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌。

**平衡/洗杂缓冲液:** 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 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  $\mu\text{m}$  或 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤，减少杂质以防阻塞柱子。

#### 1. 样品纯化 (以 Akta 为例)

1) **准备:** 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) **清洗**: 3-5 倍柱体积去离子水冲洗层析柱中储存液。
- 3) **平衡**: 用 5 倍柱体积的平衡 Buffer 平衡层析柱, 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。
- 4) **上样**: 将样品加到平衡好的层析柱中, 推荐流速 1 mL/min, 保证目的蛋白与树脂充分接触, 提高目的蛋白的回收率, 收集流出液, 待检测。

注意: 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 10-15 倍柱体积的洗杂 Buffer 进行清洗, 直到紫外吸收达到一个稳定的基线, 去除非特异性吸附的杂蛋白, 收集洗杂液, 待检测。
- 6) **洗脱**: 用洗脱 Buffer 采用一步法或线性梯度洗脱。一步洗脱中, 通常 5 倍柱体积洗脱液足够将目的蛋白洗脱下来。也可以用一个小梯度, 例如 20 倍柱体积或更多, 来分离不同结合强度的蛋白质。
- 7) **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。

## 2. 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。

## 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. 所有操作过程中, 样本需要在 4°C 或冰上操作。
3. 本产品仅作科研用途。
4. 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 <sup>2+</sup> (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
	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	

洗脱组分中无目的蛋白	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 <sub>4</sub> , 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	