

GSTSep Glutathione Agarose Resin

谷胱甘肽琼脂糖树脂（用于 GST 标签蛋白纯化）

产品简介

GSTSep Glutathione Agarose Resin 是一种 GST 标签蛋白纯化树脂，结构上以 6%交联的琼脂糖凝胶为基质，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。该设计使树脂的纯化效率得到了较大提高，使其每毫升基质可承载>20 mg GST 融合蛋白。

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 | 20507ES10/20507ES50/20507ES60/20507ES80 |
| 规格 | 10 mL /50 mL /100 mL/1000 mL |

产品性质

| | |
|---------------------------------|-------------------------------|
| 基质 (Matrix) | 6%交联的琼脂糖微球 |
| 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) | >20 mg GST 蛋白 (40 kDa) /mL 基质 |
| 最大压力 (Pressure _{Max}) | 0.1 MPa, 1 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. 样品准备

1) 细菌表达的蛋白（本说明以细菌表达蛋白为例）

a. 挑取单菌落到含有适合抗性的 LB 培养基中，根据载体说明加入相应的诱导剂诱导相应的时间。

- b. 表达结束后，将培养液转至离心瓶，7000 rpm，离心 15 min，收集菌体，然后加入 1/10 体积的平衡液和 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树脂的结合。
- c. 之后加入溶菌酶，使其工作浓度为 1 mg/mL。【注】如果表达的宿主细胞内含 pLysS 或 pLysE，可以不加入溶菌酶。
- d. 将菌体沉淀悬浮起来（如果菌液浓度高，可考虑加入 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A 和 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNase I），混匀，置于冰上超声破碎细胞，至菌液基本保持澄清。
- e. 收集上述澄清蛋白液，10000 rpm，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20-30 min。取上清，0.22 $\mu\text{m}/0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤后，置于冰上备用或-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2) 酵母、昆虫和哺乳细胞分泌表达的可溶性蛋白

将细胞培养液转移至离心瓶，5000 rpm 离心 10 min，收集上清。即可直接上柱纯化；【注】对于大量体积的上清，需加入硫酸铵进行沉淀浓缩，之后经平衡液透析后才能上柱。

2. GSTSep Glutathione Agarose Resin 重力柱的装填

- 1) 取合适规格的重力层析柱（Cat#20520ES-20524ES），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 GSTSep Glutathione Agarose Resin 混合均匀，用枪头吸取适量浆液加入重力柱中（填料实际体积占悬液的一半），打开下出口流干保护液。
- 3) 加入适量纯水冲洗填料，待柱管中液体重力流干后，关闭下出口。
- 4) 加入润洗后的上垫片，确保垫片与填料之间没有空隙，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，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

3. 样品纯化

1) 孵育法纯化

- a. 根据纯化的样品量，取适量 GSTSep Glutathione Agarose Resin 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。
- b. 向离心管中加入 5 倍填料体积的平衡液清洗填料，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。
- c. 加入样品，封闭离心管或重力柱管，4 $^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育 2~4 h 或者 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min~2 h。
- d. 孵育结束后，1000 rpm 离心 1 min，吸弃上清，或过滤收集填料，上清保留作为流穿，用于电泳鉴定。
- e. 用 5 倍填料体积的洗杂液清洗填料，1000 rpm 离心 1min 或重力柱管过滤，去除上清（注意不要吸到填料），重复 3-5 次，中间建议更换新离心管。
- f. 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。

2) 重力柱法纯化

- a. 将装填好 GSTSep Glutathione Agarose Resin 的重力柱用 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。
- b. 将样品加到平衡好的重力柱中，样品保留时间至少 2 min，保证样品和填料充分接触，收集流出液，可以反复上样增加结合效率。
- c. 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。
- d. 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。
- e. 随后依次用 3 倍柱体积的平衡液和 5 倍柱体积的去离子水清洗填料。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 \times PBS 中，置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

4. 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。

5. 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 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 |
| | | |