



Glutathione Agarose Beads 4FF预装柱 (1 mL, 5 mL, 20mL)

货号: QS01012A

Glutathione Agarose Beads 4FF预装柱是预装1毫升和5毫升填料的简便、一步式的纯化系统，用于纯化使用pGEX系列表达载体生产的谷胱甘肽S转移酶（GST）标签蛋白、其他谷胱甘肽S转移酶和谷胱甘肽结合蛋白。

使用Glutathione Agarose Beads 4FF预装柱可以直接从预处理的细菌裂解物中纯化GST标签蛋白。在温和、非变性条件下，标签蛋白被洗脱出来，从而保留了蛋白质的抗原性和功能。

该柱可用注射器、蠕动泵或如AKTAdesign™或FPLC™系统等液相色谱系统操作。

目录

一、产品描述.....	1
二、纯化操作.....	3
三、储存条件.....	4
四、故障排除.....	4
五、更多信息.....	6
六、订购信息.....	6

一、产品描述

预装柱特点

预装柱柱体由生物相容性聚丙烯制成，不会与生物分子发生相互作用。滤膜孔径经过优化，可直接在柱上加载超声波处理的未澄清裂解液，而不会造成背压问题或介质泄漏。



柱体配有入口的密封件和出口的快拆端。表1列出了预装柱的特性。

注意：预装柱不能打开或重新填充；确保适配器紧固以防止泄漏。

表 1 预装柱的特点。

柱子体积	1 mL, 5 mL, 20mL
柱子尺寸	7.8 × 25 mm (1 ml); 15.8× 27 mm (5 ml); 15.8 × 100 mm (20 ml)
最大流速	1 mL: 4 mL/min, 5 mL: 20 mL/min, 20 mL: 4 mL/min,
推荐流速	1 mL: 1 mL/min, 5 mL: 5 mL/min, 20 mL: 1 mL/min,
最大背压	3 bar (0.3 MPa)

填料特性

谷胱甘肽亲和层析柱是专为纯化使用谷胱甘肽S转移酶(GST)标签蛋白、其他谷胱甘肽S转移酶和谷胱甘肽结合蛋白而设计的。使用预装柱可以采用一步法从预处理的细菌裂解物中纯化GST标签蛋白。在温和、不破坏蛋白质抗原性和功能的条件下，标签蛋白在低盐缓冲液中被洗脱。

总结合能力约为每毫升培养基10毫克重组GST。动态结合能力将根据流速和样品而变化。如果需要去除GST标签(一种天然存在的Mr 26000蛋白质)，可以在预装柱上结合或在洗脱后用适当的位点特异性蛋白酶消化标签蛋白。在预装柱上的切割可消除分离释放蛋白与GST的额外步骤，因为GST标签仍保持结合状态。目标蛋白通过结合缓冲液进行洗脱。

表2 Glutathione Agarose Beads 4FF的特点

基质	高交联球形琼脂糖，4%
平均粒径 ¹	90 μm (d _{50v})
流速	在温度为20°C、柱高1米、柱床高度20厘米的条件下，使用与水在3 bar (0.3 MPa) 以下时粘度相同的缓冲液，流速可达700厘米/小时。
动态结合载量 ²	≥10mg GST-tagged protein / mL填料
pH工作范围	3 – 12
工作温度	4°C – 30°C
化学稳定性	所有常用的水相缓冲液，例如：1 M 乙酸缓冲液 (pH 4.0) 和6 M 胍盐酸盐，在室温下孵育1小时。
储存溶液	20%乙醇



- ¹ d_{50v} 是累积体积分布中的中等颗粒大小。
- ² 在Tricorn™ 5/100柱中，以1分钟的停留时间、600 cm/h的流速，在50 mM Tris-HCl缓冲液 (pH 8.0) 中测量的10%穿透时的动态结合能力。
- ³ 短期pH: 可以在不影响功能的情况下进行清洁或消毒的pH范围。长期pH: 可以在不影响功能的情况下操作的pH范围。

二、纯化操作

这些柱子可以用注射器、蠕动泵或液相色谱系统操作。

缓冲液准备

用于缓冲液准备的水和化学试剂应具有高纯度。我们建议在使用前将缓冲液通过0.45 μm 滤膜过滤。

结合缓冲液: PBS, pH 7.3 (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , pH 7.3)

洗脱缓冲液: 50 mM Tris-HCl, 10 mM 还原型谷胱甘肽, pH 8.0

注意: 结合和洗脱缓冲液中可加入1-10 mM DTT。

样品准备

在将样品应用于柱子之前，应将样品离心或通过45 μm 滤膜过滤。如果样品太粘稠，用结合缓冲液稀释以防止堵塞柱子。

纯化

1. 用结合缓冲液填充泵管或注射器。将柱子连接到注射器 (使用提供的适配器) 或泵管上，以“滴到滴”的方式连接，以避免将空气引入柱子中。
2. 将柱出口处的快拆端取下。
3. 用5个柱体积的结合缓冲液平衡柱子。
4. 使用带有卢尔适配器的注射器或通过泵将样品注入柱中。为了获得最佳效果，在样品应用期间使用0.2-1 ml/min (1 ml柱) 和1-5 ml/min (5 ml柱) 的流速。
5. 用5-10倍柱体积的结合缓冲液清洗，或者直到流出液中不再有物质出现为止。推荐的流速为1至2毫升/分钟 (1毫升柱) 和5至10毫升/分钟 (5毫升柱)。
6. 用5-10倍柱体积的洗脱缓冲液进行洗脱。推荐的流速为1至2 ml/min (1毫升柱) 和5至10 ml/min (5毫升柱)。

注意:

• 影响GST-标签蛋白或其他谷胱甘肽结合蛋白与预装柱结合的最重要参数之一是流速。由于GST与谷胱甘肽之间的结合速度相对较慢，因此在样品应用期间保持低流速以实现最大结合容量非



常重要。蛋白质特性、pH 和温度是可能影响结合容量的其他因素。

- 融合蛋白的洗脱体积和时间可能各不相同。可能需要进行额外的高浓度谷胱甘肽洗脱。如果必要，可以使用SDS-PAGE 结合 Western Blot 对柱流出物、洗涤液和洗脱物中的GST-标签蛋白进行监测。

- GST 检测模块可用于优化洗脱条件或跟踪GST-标签蛋白纯化的步骤。该模块可通过生化或免疫法识别带有GST标签的蛋白质。• 可以通过测量280纳米处的吸光度来估算GST标签蛋白的浓度。GST标签可以近似为 $A_{280} \approx 1$ 对应于约0.5 mg/ml。

- 也可以通过标准的显色法（如Lowry、BCA和Bradford法）来确定GST标签蛋白的浓度。如果使用Lowry或BCA法，样本必须先用脱盐柱或透析以PBS去除谷胱甘肽，以避免干扰蛋白质的测量。Bradford法可以在存在谷胱甘肽的情况下使用。

- 预装柱的重复使用取决于样本的性质，仅应在使用相同样本的情况下进行，以防止交叉污染。

清洗预装柱

如果介质看起来失去了结合能力，可能是由于沉淀物、变性或非特异性结合的蛋白质的积累所致。

去除沉淀或变性物质：

- 用6 M 氯化胍溶液洗涤2柱体积，然后用5柱体积的PBS洗涤。

去除亲水性结合的物质：

- 用70%乙醇或1 % Triton™ X-100溶液洗涤2-3柱体积，然后用5柱体积的PBS洗涤。

三、储存条件

将预装柱保存在20%乙醇中，温度为4至30°C。

四、故障排除

GST标签蛋白无法与预装柱结合

- GST标记蛋白在超声处理后变性：过度的超声处理可能会使标记蛋白变性，从而使其无法与预装柱结合。在细胞裂解过程中应使用温和的超声条件。

- 在细胞裂解前加入DTT：在细胞裂解前将DTT的终浓度添加到1-10 mM范围内，可能会显著增加某些GST标签蛋白与预装柱的结合。

- 融合伴侣可能改变了GST的构象，从而降低了其亲和力。通过将结合温度降低至+4°C并限制柱洗涤，可以获得足够的结果。

- 使用前平衡预装柱：GST标签蛋白与预装柱的结合在pH小于6.5或大于8.0时效率不高。在将细胞裂解液应用于预装柱之前，请确保该柱已用pH为6.5至8.0的缓冲液（例如PBS）平衡。

- 使用新的预装柱：如果预装柱已经使用了多次，可能需要使用新的预装柱。

- 减少加样时的流速，参见第6页的说明。GST标签蛋白不能有效地从预装柱中洗脱。

- 增加洗脱时间：降低洗脱流速。



• 增加洗脱缓冲液的体积：有时，尤其是在融合蛋白柱内切割后，可能需要更大的缓冲液体积来洗脱融合蛋白。

• 增加洗脱缓冲液中谷胱甘肽的浓度：本协议中推荐的10 mM浓度对于大多数应用已经足够，但存在例外情况。尝试使用50 mM Tris-HCl、20-40 mM 还原型谷胱甘肽、pH 8.0作为洗脱缓冲液。

• 增加洗脱缓冲液的pH：低pH可能会限制从GSTrap FF中洗脱。将洗脱缓冲液的pH提高到8-9可能可以改善洗脱效果，而不需要增加用于洗脱的谷胱甘肽浓度。

• 增加洗脱缓冲液的离子强度：向洗脱缓冲液中添加0.1-0.2 M NaCl也可能改善结果。

• 在洗脱缓冲液中加入非离子型表面活性剂：非特异性疏水相互作用可能阻止融合蛋白从预装柱中溶解和洗脱。添加非离子型表面活性剂可以改善结果。向洗脱液中加入0.1% Triton X-100或2% N-辛基葡萄糖苷可以显著改善某些GST标签蛋白的洗脱效果。

• 电泳/Western Blot分析洗脱的靶蛋白时观察到多个条带：

• Mr 70,000蛋白与GST标签蛋白共沉淀：Mr 70,000蛋白可能是大肠杆菌基因dnaK的蛋白质产物。该蛋白参与大肠杆菌中的蛋白质折叠。据报道，在将融合蛋白在37°C下在50 mM Tris-HCl、2 mM ATP、10 mM MgSO₄、pH 7.4的溶液中孵育10分钟后，这种结合可以被破坏。

或者，通过ATP-琼脂糖或离子交换去除DnaK蛋白。

• 添加蛋白酶抑制剂：多个条带可能是由于标签蛋白部分被蛋白酶降解所致。向裂解液中加入1 mM PMSF可以改善结果。一种无毒、水溶性的PMSF替代品是4-(2-氨基乙基)-苯磺酰氟氢氯化物 (AEBSF)。

请注意：在用凝血酶或因子Xa切割之前，必须去除丝氨酸蛋白酶抑制剂。

• 使用无蛋白酶宿主：宿主细菌中的蛋白酶水解可能导致出现多个条带。如果出现这种情况，可能需要使用无蛋白酶缺陷的菌株（例如lon-或ompT）。E. coli BL21提供pGEX载体。该菌株含有ompT。

• 减少超声波处理：通过部分悬浮液澄清可见细胞破裂，可以通过显微镜检查来确认。在超声波处理前加入溶菌酶（0.1体积的10 mg/ml溶菌酶溶液（在25 mM Tris-HCl, pH 8.0中））可能改善结果。避免起泡，因为这会干扰超声波处理。

过度超声可能会导致宿主蛋白与GST标签蛋白共同纯化

包括额外的纯化步骤：额外的条带可能由多种被称为伴侣蛋白的蛋白质引起，它们参与大肠杆菌中新生蛋白质的正确折叠。这些蛋白质包括但不限于：DnaK (Mr约为70000)、DnaJ (Mr约为37000)、GrpE (Mr约为40000)、GroEL (Mr约为57000)和GroES (Mr约为10000)。已描述了几种从这些共纯化蛋白质中纯化GST标签蛋白的方法。

与大肠杆菌蛋白质交叉吸附抗体：根据抗GST抗体的来源，它可能含有与融合蛋白样本中可能存在的各种大肠杆菌蛋白质发生反应的抗体。将抗体与大肠杆菌超声液混合以从制剂中去除抗大肠杆菌抗体。

GST标签蛋白不完全切割

• 如果使用的是PreScission蛋白酶、凝血酶或因子Xa与标签蛋白的比例不正确：检查消化过程中的标签蛋白量。请注意，预装柱对GST的容量约为10 mg/ml填料。然而，在大多数纯化过程中，填料中不会饱和地存在标签蛋白。

比例：PreScission蛋白酶，至少10单位/毫克标签蛋白。

凝血酶，至少10单位/毫克标签蛋白。

因子Xa，至少1% (w/w) 标签蛋白。对于某些标签蛋白，可以使用高达5%的因子Xa。最佳用量必须



通过实验确定。

在某些情况下，发现1 mg/ml的标签蛋白浓度可获得最佳结果。向反应缓冲液中添加 $\leq 0.5\%$ (w/v) 可以显著改善某些标签蛋白的因子Xa切割效果。应测试各种浓度的SDS以找到最佳浓度。

- 增加孵育时间和酶浓度：对于PreScission蛋白酶、凝血酶或因子Xa，如果标记蛋白在长时间孵育后未被降解，则将反应时间增加至20小时以上。也可以增加酶的用量。
- 确认存在特定的切割位点：检查构建体的DNA序列，并将其与已知序列进行比较，以确认在克隆您的标记蛋白期间，用于酶的特定位点是否未被改变。确保不存在酶抑制剂。
- PreScission蛋白酶：在切割前，使用50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM DTT和pH 7.5的缓冲液对标记蛋白进行缓冲液交换或透析。
- 因子Xa：根据样品体积，使用HiTrap Desalting、PD-10柱或HiPrep 26/10 Desalting进行缓冲液交换，或使用50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、1 mM CaCl₂和pH 7.5的缓冲液进行透析。
- 因子Xa未被正确激活：功能性的因子Xa需要使用Russell蝥蛇毒激活因子X。激活条件为：Russell蝥蛇毒与因子Xa的比例为1%，在8 mM Tris-HCl、70 mM NaCl、8 mM CaCl₂和pH 8.0的条件下进行激活。将样本在37°C下孵育5分钟。

- 因子Xa识别序列之后的第一个氨基酸是Arg或Pro：检查融合伴侣的序列以确保因子Xa识别序列之后的前三个核苷酸不编码为Arg或Pro。

- 在酶切后SDS凝胶上观察到多个条带：

确定条带出现的时间：在PreScission蛋白酶、凝血酶或因子Xa切割前，测试以确保没有其他条带存在。这些条带可能是宿主细菌的蛋白酶作用的结果。

- 标记伴侣可能包含PreScission蛋白酶、凝血酶或因子Xa的识别序列：检查序列。

五、更多信息

更多有关优化、故障排除、清洗等其他主题的信息可以在[公众号：千株松生物](#)上查找。

六、订购信息

产品名称	产品规格	产品货号
Capto Q预装柱	1 ml, 5ml, 20ml	QS01048A
SP 预装柱		QS01047A
Ni NTA Agarose Beads 6FF预装柱		QS01002A
Ni TED Agarose Beads 6FF预装柱		QS01003A
Glutathione Agarose Beads 4FF预装柱		QS01012A
rProtein A Agarose 4FF预装柱		QS01008A
rProtein G Agarose 4FF预装柱		QS01009A