



Glutathione Agarose Beads 4FF

货号：QS01012

目录

1	描述.....	1
2	操作步骤.....	2
3	批量纯化.....	2
4	柱纯化.....	3
5	清洗与存储.....	4
6	故障排除.....	4
7	订购信息.....	4

1 描述

介质特性

谷胱甘肽配体与高度交联的4%琼脂糖结合。这种结合方式经过优化，能够为GST标签蛋白及其他谷胱甘肽结合蛋白提供高结合能力。

总结合能力约为每毫升介质结合10毫克重组GST标签蛋白。动态结合能力会因多种因素而变化，如目标蛋白、流速等。

如果需要去除GST标签（一种天然存在的蛋白质，分子量为26,000），可以在蛋白结合到谷胱甘肽琼脂糖填料时，使用适当的位点特异性蛋白酶进行消化，或者在洗脱后进行消化。对于结合在柱上/散装介质上的GST标签蛋白进行切割，可以省去将释放的蛋白与GST分离的额外步骤，因为GST标签仍然保持结合状态。切割后的目标蛋白使用结合缓冲液进行洗脱。

表 1. Glutathione Agarose Beads 4FF的特性

特性	描述
基质	高度交联的 4% 琼脂糖
配体	谷胱甘肽
平均粒径	90 μm
总结合能力	约 10 mg 重组 GST/mL 介质
pH 稳定性	2-12 (短期) ; 2-8 (长期)
存储溶液	20%乙醇



2 操作步骤

缓冲液准备

用于配制缓冲液的水和化学试剂应具有高纯度。建议在使用前通过 0.45 μm 滤膜过滤缓冲液。

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: 结合缓冲液和洗脱缓冲液中可加入 1 至 10 mM DTT (二硫苏糖醇)。

样品准备

在上样前, 样品应离心和/或通过滤膜过滤。

如果样品过于粘稠, 可用结合缓冲液稀释, 以防止柱子堵塞。在进行批量纯化时, 无需过滤样品。

3 批量纯化

Glutathione Agarose Beads 4FF 的制备

步骤 操作

- 1 确定纯化所需的 Glutathione Agarose Beads 4FF 的介质体积。
注意: 谷胱甘肽琼脂糖凝胶 4 快速流动以 20% 乙醇保存。使用前需配制 50% 的浆液。
- 2 轻轻摇晃 Glutathione Agarose Beads 4FF 的瓶子以重悬浆液。
- 3 用移液管或量筒取出所需量的浆液, 转移至适当容器中。
- 4 以 $500 \times g$ 离心 5 分钟沉降介质, 小心弃去上清。
- 5 按每 1 mL 浆液加入 5 mL PBS 洗涤介质, 颠倒混匀。
- 6 以 $500 \times g$ 离心 5 分钟沉降介质, 小心弃去上清。
- 7 重复步骤 5 和 6 一次。

批量纯化流程

步骤 操作

- 1 将细胞裂解液加入制备好的 Glutathione Agarose Beads 4FF 中, 室温孵育至少 30 分钟, 轻柔翻转混匀。
- 2 用移液管或量筒将混合物转移至适当容器中。
- 3 以 $500 \times g$ 离心 5 分钟沉降介质, 弃去上清 (流穿液), 保留用于结合效率分析 (如 SDS-PAGE)。
- 4 按每 1 mL 浆液加入 5 mL PBS 洗涤介质, 颠倒混匀。

**步骤 操作**

- 5 以 $500 \times g$ 离心 5 分钟沉降介质，弃去上清（洗涤液），保留用于 SDS-PAGE 分析。
- 6 重复步骤 4 和 5 两次，共洗涤三次。
- 7 按每 1 mL 浆液加入 0.5 mL 洗脱缓冲液（50 mM Tris-HCl, 10 mM 还原型谷胱甘肽, pH 8.0），室温轻柔翻转孵育 5–10 分钟。
- 8 以 $500 \times g$ 离心 5 分钟沉降介质，收集上清（洗脱蛋白）。
- 9 重复步骤 7 和 8 两次，共洗脱三次。分别检测三次洗脱液中的蛋白，合并目标组分。

注意：

- GST 与谷胱甘肽的结合动力学较慢，需确保孵育时间充足以达最大结合能力。不同 GST 融合蛋白的结合效率可能差异显著。
- 洗脱体积和时间因蛋白而异，可尝试提高谷胱甘肽浓度。建议通过 SDS-PAGE 或 Western Blot 监测各步骤样品。

4 柱纯化**色谱柱选择**

预装柱选项：1 mL、5 mL 和 20 mL 预装柱。

装柱步骤**步骤 操作**

- 1 所有材料需平衡至纯化操作温度。
- 2 用 PBS (pH 7.3) 冲洗柱端以排出气泡，确保柱网下无气泡残留，关闭出口并保留 1–2 cm PBS。
- 3 摇匀介质浆液，估算所需浆液量（介质浆液浓度约 60%）。
- 4 沿柱壁缓慢倒入浆液以减少气泡引入。
- 5 立即用 PBS 填充色谱柱，安装柱顶盖并连接泵。
- 6 以最大 1 bar 压力或推荐流速装柱，持续至少 3 倍柱床体积后标记柱床高度。
- 7 停止泵，关闭出口，移除顶盖并用 PBS 填充至柱顶形成弯液面。
- 8 倾斜插入适配器，避免残留气泡，缓慢下推至标记高度后锁定，连接泵开始平衡。

柱纯化流程**步骤 操作**

- 1 用 5 倍柱体积结合缓冲液平衡色谱柱。



步骤 操作

- 2 上样（样品需提前离心或过滤）。
- 3 用 5–10 倍柱体积结合缓冲液洗涤至流穿液中无蛋白，保留流穿液用于结合效率分析。
- 4 用 5–10 倍柱体积洗脱缓冲液洗脱目标蛋白。

注意：

- **流速**是影响结合的关键参数，建议低流速上样以提高结合效率。
- 洗脱条件需优化，必要时提高谷胱甘肽浓度或调整 pH（8–9）。

5 清洗与存储

清洗

- **沉淀或变性蛋白**：用 2 倍柱体积 6 M 盐酸胍清洗，随后 5 倍柱体积 PBS 冲洗。
- **疏水结合物**：用 3–4 倍柱体积 70% 乙醇或 2 倍柱体积 1% Triton X-100 清洗，随后 5 倍柱体积 PBS 冲洗。

存储：装填柱于 4–30°C 下以 20% 乙醇保存。

6 故障排除

蛋白不结合

- 优化超声裂解条件，避免过度变性。
- 添加 1–10 mM DTT 提高结合效率。
- 检查介质 pH（6.5–8.0）并确保充分平衡。

洗脱效率低

- 延长孵育时间、降低流速或提高谷胱甘肽浓度（20–40 mM）。
- 添加 0.1% Triton X-100 或 2% N-辛基葡萄糖苷改善疏水蛋白洗脱。

电泳杂带

- 添加蛋白酶抑制剂（如 1 mM PMSF）或使用蛋白酶缺陷型宿主菌（如 E. coli BL21）。
- 优化超声条件或增加离子交换纯化步骤去除伴侣蛋白（如 DnaK）。

酶切不完全

- 确认酶与蛋白比例（PreScission/凝血酶 ≥ 10 U/mg，Factor Xa $\geq 1\%$ w/w）。
- 检查克隆序列中酶切位点完整性，避免抑制剂干扰（如透析去除谷胱甘肽）。

7 订购信息

联系电话：17302508337（微信同号）。