

Glutathione 4FF Beads

KP204 100 毫升

1. 产品介绍

Glutathione 4FF Beads 是用于谷胱甘肽 S-转移酶标签蛋白(GST 融合蛋白)、谷胱甘肽 S-转移酶和谷胱甘肽依赖蛋白的分离纯化。GST 亲和层析操作条件温和、特异性强,有利于蛋白的活性保持和高纯度目标蛋白的快速制备,通常一步亲和层析即可得到高纯度的目标蛋白。

Glutathione 4FF Beads 具有结合载量高、特异性强及良好的物理和化学稳定性、易放大、寿命长等特点。

表 1. Glutathione 4FF Beads 产品性能

产品名称	Glutathione 4FF Beads
配基	谷胱甘肽
基质	4%高度交联琼脂糖
粒径	45 μ m~165 μ m
每毫升载量	>10mgGST 融合蛋白
推荐流速	100-300cm/h
最大耐压	0.3MPa
pH 稳定性	3~12
化学稳定性	稳定于常用的水缓冲液,70%乙醇, 30%异丙酮, 6M 盐酸胍,1M 乙酸(pH4)
储存温度	20%乙醇 2°C~8°C

2. 操作说明

Glutathione 4FF Beads 可以在实验室被填装普通的重力柱或者填充到到中压层析柱中,以扩大产量。将

填料填充到层析柱中,根据样本量和填料载量选择合适的层析柱和柱高。

2.1 缓冲液的准备

缓冲液在使用前最好用 0.22 μ m 或者 0.45 μ m 滤膜过滤。

平衡缓冲液: PBS PH7.4 (140 mM NaCl , 2.7 mM KCl , 10 mM Na₂HPO₄ , 1.8 mM KH₂PO₄ , pH 7.4)

洗脱缓冲液:50mM Tris-HCl+10mM GSH, pH 8.0,GSH 浓度需要根据目标蛋白的结合力进行适当调整,GSH 易被氧化, 现用现配。

2.2 样品准备

样品在上样前建议离心或用 0.22 μ m 或 0.45 μ m 滤膜过滤 , 提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

2.2.1 细菌或酵母表达的蛋白

- 1) 挑取单菌落到培养基中 , 根据载体使用说明 , 加入相应浓度的诱导剂诱导相应的时间。
- 2) 表达结束后 , 将培养液转移到离心杯中 , 7,000 rpm(7,500 \times g) , 离心 15 min 收集菌体 , 然后按照菌体: 平衡液=1 : 10 (W/V) 加入平衡液 , 加入终浓度为 1 mM 的 PMSF。加入溶菌酶 (工作浓度为 0.2-0.4 mg/ml , 如果表达的宿主细胞内含 pLysS 或 pLysE , 可以不加溶菌酶) , (同时也可加入其他蛋白酶抑制剂 , 但不能影响目的蛋白与填料的结合) 。
- 3) 将菌体沉淀悬浮起来 , (如果菌液浓度高 , 也可考虑加入 10 μ g/ml RNaseA 和 5 μ g/ml DNase I) , 混匀 , 放置于冰上 , 然后冰上超声破碎细胞 , 至菌液基本保持澄清。
- 4) 将澄清的破碎液转移至离心管中 , 10,000 rpm(15,000 \times g) , 4 $^{\circ}$ C离心 20-30 min。取上清 , 置于冰上备用或-20 $^{\circ}$ C保存。

2.2.2 酵母、昆虫和哺乳细胞分泌表达可溶性蛋白

- 1) 将细胞培养液转移至离心杯 , 5,000 rpm(3,800 \times g) , 离心 10 min , 收集菌体得上清 , 即可直接加入柱子使用。
- 2) 对于大量体积的上清 , 需加入硫酸铵沉淀浓缩后 , 蛋白还需用平衡液透析后才能加入柱子。

2.3 Glutathione 4FF Beads 重力柱的装填

- 1) 取合适规格的重力层析柱 , 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 Glutathione Beads 混合均匀，用枪头吸取适量浆液加入至重力柱中（介质实际体积占悬液的一半），打开下出口流干保护液。
- 3) 加入适量纯水冲洗介质，待柱管中液体重力流干后，关闭下出口。
- 4) 装入润洗后的上垫片，确保垫片与填料之前没有空隙，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，2-8°C保存。

2.4 样品的纯化

2.4.1 孵育法纯化

- 1) 根据纯化的样品量，取适量 Glutathione Beads 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。
- 2) 向离心管中加入 5 倍介质体积的平衡缓冲液清洗介质，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。
- 3) 加入样品，封闭离心管或重力柱管，4°C振荡孵育 2-4 h 或者 37°C孵育 30 min-2h。
- 4) 孵育结束后，1000 rpm 离心 1 min，吸弃上清，或过滤收集介质，上清保留作为流穿，用于电泳鉴定。
- 5) 用 5 倍介质体积的平衡缓冲液清洗介质，1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管过滤，去除上清（注意不要吸到介质），重复 3-5 次，中间建议更换新离心管。
- 6) 加入 3-5 倍柱体积的洗脱缓冲液进行洗脱，室温孵育 5min，1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管收集洗脱液，可重复 2-3 次。

2.4.2 重力柱法纯化

- 1) 将装填好的 Glutathione Beads 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。（流出液 PH 和电导和平衡液一致）
- 2) 将样品加到平衡好的重力柱中，样品保留时间至少 2 min，保证样品和介质充分接触，收集流出液，可以反复上样增加结合效率。
- 3) 用 10-15 倍柱体积的平衡液进行洗杂，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液。
- 4) 使用 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。

上述步骤洗脱结束后，用平衡液冲洗 3 倍柱体积，然后用纯水冲洗 5 倍柱体积，再用保冲洗 2 个柱体积，然后将介质置于 2-8°C 保存。

3. 在位清洗

介质使用数次(具体次数与原料的种类和来源及实验要求有关)后,介质上会有部分沉淀物、变性蛋白及非特异性吸附的蛋白,导致介质结合能力的下降,需要对介质进行在位清洗。

1)去除沉淀物及变性蛋白,可用 2CV6 M 盐酸胍清洗,然后立即用 5 CV 中性 PBS 缓冲液平衡至中性。

2)去除疏水性结合的蛋白、脂蛋白和脂类物质,可用 3~4CV 的 70%乙醇或 30%异丙醇清洗(20min 以上),并用 3~5CV 的纯水冲洗。

3)也可用 2CV 0.01~0.1M 的 NaOH 清洗,然后立即用 5CV 中性 PBS 缓冲液平衡至中性(优先采用步骤 1 和 2 清洗)。