

Glutathione Agarose 4FF

- **规格:** 5 mL/10 mL/100 mL
- **应用:** GST融合蛋白纯化/免疫沉淀

- **产品储存**

保存液: 含20%乙醇的PBS

储存条件: 4-8 °C (避免冻存)

保质期: 12个月

运输: 冰袋运输

- **产品简介**

Glutathione Agarose 4FF适用于分离纯化GST标签蛋白、谷胱甘肽S-转移酶或谷胱甘肽依赖性蛋白, 以4%琼脂糖凝胶为基质, 用化学方法共价结合了还原型谷胱甘肽制作而成。

特点:

1. 快速、简单 (一步纯化)
2. 载量高、流速快、易于放大
3. 温和的洗脱条件可以完整的保留蛋白的生物学活性

- **产品属性**

项目	参数
基质	高度交联4%的琼脂糖
粒径范围	45-165 μm
结合载量	>20 mg (GST标签蛋白-40kDa)/ml(介质)
pH稳定性	3-12
化学稳定性	所有常用水溶液, 如: 1M醋酸盐, pH 4.0、0.1M NaOH、70% 乙醇、8M 尿素、6M 盐酸胍。
流速	$\geq 250\text{cm/h}$
操作压力	0.1MPa
贮存溶液	含20%乙醇的PBS
贮存温度	2-8°C

● 纯化流程

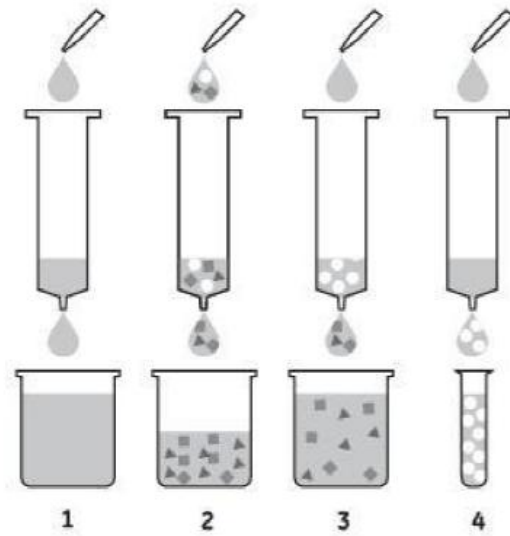


图 1. 使用 Glutathione Agarose 4FF 重力柱进行蛋白纯化流程示意图

(Step 1:平衡; Step 2:上样; Step 3:洗杂; Step 4:洗脱)

1.1 缓冲液的准备

平衡/洗杂液: PBS

洗脱液: PBS, 10 mM Glutathione (reduced)

注: 根据蛋白性质, 平衡液和洗脱液中可加入 1-10 mM DTT; 所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.45 μm 滤膜过滤; 本产品适配各种缓冲液, 实际应用中可根据需求配置合适缓冲液

1.2 样品准备

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

1.3 样品纯化

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 Agarose 4FF 混合均匀, 用枪头吸取适量浆液加入重力柱中(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, 注意避免液泡。
- 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 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

纯化步骤:

- 1) 将装填好的 Glutathione Agarose 4FF 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。
- 2) 将样品加到平衡好的重力柱中, 样品保留时间至少 2min, 样品量大可持续、循环流穿, 保证样品和介质充分接触, 收集流出液, 反复上样可增加结合效率。

- 3) 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。
- 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。

1.4 SDS-PAGE 检测

将使用纯化产品得到的样品(包括流出组分、洗杂组分和洗脱组分)以及原始样品使用SDS-PAGE检测纯化效果。

2. 在位清洗

GST标签蛋白纯化产品可以重复使用而无需再生，但随着非特异性结合的蛋白的增多和蛋白的聚集，往往造成流速和结合载量性能下降，这时需要对树脂进行清洗以去除沉淀或变性物质，建议使用下面的方法：

- 1) 用2倍柱体积的 6M 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) 去除疏水性吸附造成的非特异性吸附物质可用 3-4 倍柱体积的70%乙醇或2倍柱体积的 1% Triton X-100 清洗，然后立即用5倍柱体积的 PBS pH 7.4 清洗。

● 常见问题及解决方案

问题	可能原因	解决方法
	GST 标签蛋白变性了	
	过度的裂解使目的蛋白变性	使用温和的裂解条件，实验条件以经验为准
	目的蛋白聚集产生了沉淀	在细胞裂解前溶液中加入 DTT, 终浓度为 1-20 mM
GST 融合蛋白的产量很低或无法检测到	融合蛋白改变了 GST 构象, 影响了目的蛋白结合能力	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, 有可能融合蛋白改变 GST 的构象从而降低了 GST 标签蛋白的亲和力, 可尝试增加 linker 长度
		降低结合温度至 4°C, 充分地清洗
	融合蛋白形成包涵体	采用较低的温度(20-30°C)培养细胞, 或者诱导过程中降低诱导剂的终浓度至 <0.1 mM, 或者缩短诱导时间
		复性后纯化
	融合蛋白不能有效结合高亲和力 GST 纯	增加填料与蛋白结合时间

化介质

融合蛋白并不包含有活性的 GST	采用温和的超声破碎条件或者其他的裂解条件, 比如采用溶菌酶
融合蛋白被蛋白酶降解	在裂解步骤或洗涤步骤加入适量的蛋白酶抑制剂, 如 PMSF
融合蛋白不能有效地从树脂上洗脱下来	延长洗脱时间, 或者增加洗脱液中还原性谷胱甘的浓度至 15 mM 或者更高 调节洗脱液的 pH 值至 8.0~9.0 在洗脱液中加入 Triton X-100(终浓度 0.1%)、辛基-葡萄糖(终浓度 2%)或者 NaCl(终浓度 0.1-1 M)
一些宿主蛋白, 比如伴侣蛋白, 可能会和融合蛋白互相作用	在洗涤液中加入 DTT(终浓度 5 mM)。在纯化前将重组蛋白溶液和伴侣蛋白溶液(2 mM ATP 10mM MgSO ₄ , 50 mM Tris-HC)37°C 振荡 10 min
过度的超声处理会导致一些蛋白与融合蛋白相结合	采用温和的超声破碎条件或者其他的裂解条件
有些白会与融合蛋白或树脂发生非特异性结合	优化洗涤条件: 加入一些洗涤剂如 1% Triton X-100、1% Tween-20、0.03% SDS 或者 0.1% NP-40 可以降低非特异性吸附。优化洗涤液中的盐浓度也可以降低非特异性吸附

仅供科研使用, 不用于动物或人类诊断或治疗用途