

谷胱甘肽高速层析介质（4FF）

Glutathione Beads 4FF

货号	规格
BDTL0009-10	10ml
BDTL0009-50	50ml
BDTL0009-100	100ml

1. 产品介绍

谷胱甘肽高速层析介质（4FF）可以纯化各种表达系统融合表达的谷胱甘肽-S-转移酶的目的蛋白、谷胱甘肽依赖性蛋白和谷胱甘肽转移酶的重组衍生物。本层析介质是以高度交联的4%琼脂糖凝胶为基质，因其耐压的基质，该产品更适合用于工业大规模蛋白的纯化，可以在相对较高的流速下，实现对目的蛋白的纯化。本层析介质可以耐受最高0.3 MPa的压力，更稳定。主要性能见下表。

谷胱甘肽高速层析介质（4FF）性能表

性能	指标
基质	高度交联的4%琼脂糖微球
配体	通过12原子间隔臂偶联的谷胱甘肽
载量（/ml 介质）	>10 mg GST 蛋白（26 kDa）
粒径（ μm ）	45-165
最大流速	0.3 MPa, 3 bar
pH 稳定范围	3-12
储存缓冲液	20% 乙醇的1×PBS
储存温度	2-8°C

2. 纯化流程

2.1 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，减少杂质，提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

2.2 层析介质装填

谷胱甘肽高速层析介质（4FF）被广泛应用于工业纯化，因此，涉及到各种中压色谱层析柱的装填。

层析柱的装填（使用储液器装填）

1. 用去离子水冲洗层析柱底筛板与接头，确保柱底筛板上无气泡，关闭柱底出口，并在柱底部留出 1-2cm 的去离子水。
2. 将树脂悬浮起来，小心的将浆液连续地倒入层析柱中。用玻璃棒沿着柱壁倒入浆液可减少气泡的产生。
3. 如果使用储液器，应立即在层析柱和储液器中加满水，将进样分配器放置于浆液表面，连接至泵上，避免在分配器或进样管中产生气泡。
4. 打开层析柱底部出口，开起泵，使其在设定的流速下进行。最初应让缓冲液缓慢流过层析柱，然后缓慢增加至最终流速，这样可避免液压对所形成柱床的冲击，也可以避免柱床形成的不均匀。如果达不到推荐的压力或流速，可以用你所使用泵的最大流速，这样也可以得到一个很好的装填效果。（注意：在随后的色谱程序中，不要超过最大装柱流速的 75%）当柱床高度稳定后，在最后的装柱流速下至少再上 3 倍柱床体积的去离子水。标上柱床高度。
5. 关闭泵，关闭层析柱出口。
6. 如果使用储液器，去除储液器，将分配器至于层析柱中。
7. 将分配器推向柱子至标记的柱床高度处。允许装柱液进入分配器，锁紧分配器接头。
8. 将装填好的层析柱连接至泵或色谱系统中，开始平衡。如果需要可以重新调整分配器。

2.3 样品纯化

1. 将本层析介质装入合适的层析柱，用 5 倍柱体积的结合 Buffer 进行平衡，使层析介质处于与目的蛋白相同的缓冲体系下，起到保护蛋白的作用。
2. 将样品加到平衡好的层析介质中（保证目的蛋白与层析介质充分接触，提高目的蛋白的回收率），收集流出液。

3. 用10-15 倍柱体积的洗杂Buffer 进行清洗，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 Buffer，收集洗脱液，即目的蛋白组分。
5. 依次使用3 倍柱体积的结合 Buffer 和5 倍柱体积的去离子水平衡层析介质，最后再用5 倍柱体积的20% 的乙醇平衡，然后保存在等体积的 20%的乙醇中，置于 4℃保存，防止层析介质被细菌污染。

2.4 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。

3. 层析介质清洗

本层析介质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都下降，这时需要对层析介质进行清洗。

➤ 去除一些沉淀或变性物质

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。

➤ 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 倍柱体积的 1% Triton X-100 清洗，然后立即用 5 倍柱体积的 PBS, pH 7.4 清洗。

4. 问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
柱子反压过高	层析介质被堵塞	按照第3部分进行层析介质清洗。 裂解液中含有微小的固体颗粒，建议上柱前使用滤膜（0.22 or 0.45 μm）过滤，或者离心去除。
	样品太粘稠	样品中含有高浓度的核酸，加长破碎时间直至粘度降低，或者添加DNase I（终浓度5 μg/ml），Mg ²⁺ （终浓度 1 mM），冰上孵育10-15分钟。
	缓冲液太粘稠	有机溶剂或者蛋白稳定试剂（如甘油等）可能会引起反压增高，降低操作流速。
洗脱组份中没有目的蛋白	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	
	目的蛋白聚集产生了沉淀	在细胞裂解前溶液中加入DTT，终浓度为1–20 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℃，充分清洗。
	柱子平衡时间太短，目的蛋白不是在pH6.5-pH8范围内结合的	用pH 6.5-8.0的Buffer进行充分的平衡（例如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	增加洗脱液中谷胱甘肽浓度，可尝试用50 mM Tris-HCl, 20-40 mM还原型谷胱甘肽, pH8.0洗脱。
	低pH影响洗脱	在不增加洗脱液中的谷胱甘肽量时，提高洗脱液中pH至8-9会有改善。
		增加洗脱液中离子强度，如0.1-0.2 M NaCl。
	洗脱液中的谷胱甘肽被氧化	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与洗脱	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。	
电泳或Western Blot检测中发现多条带	Mr 70000 蛋白（Mr相对分子量）与目的蛋白一起被纯化出来	Mr 70000蛋白是大肠杆菌基因dnaK的产物，可以通过上样前加入50 mM Tris-HCl, 2 mM ATP, 10 mM MgSO ₄ , pH 7.4在37℃加热10分钟去除。
		可以通过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。
		有可能是蛋白酶对目的蛋白部分降解造成的，可以使用蛋白酶缺陷型宿主菌(如lon-或ompT)。
	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倍的10 mg/ml溶菌酶，25 mM Tris-HCl, pH 8.0），避免发泡导致蛋白变性，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）和GroES（Mr-10000），可再进行一次纯化可以改善。	
抗体与E.coli的各种蛋白反应	抗体吸附E.coli蛋白：GST-抗体。超声处理去除GST抗体。可以用Western Blots检测。	

5. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
谷胱甘肽层析介质 (GST 纯化专用)	BDTL0007-10	10ml
	BDTL0007-50	50ml
	BDTL0007-100	100ml
谷胱甘肽层析介质重力预装柱套 装	BDTL0007-K	套
Glutathione Beads 4FF	SA010010	10ml
	SA010050	50ml
	SA010100	100ml
GSTCap 4FF	SA010C11	1×1 ml
	SA010C51	5×1 ml
	SA010C15	1×5 ml
	SA010C55	5×5 ml
	SA010CS	3×1 ml+1×5 ml