



兰博利德 LABLEAD

高 新 技 术 企 业



### Glutathione Beads 4FF (GST 填料)

货号: G10510

存储条件: 2-8 °C

#### 产品说明:

Glutathione Beads 4FF 可以一步纯化各种表达系统表达的谷胱甘肽-S-转移酶、谷胱甘肽依赖性蛋白和谷胱甘肽转移酶的重组衍生物。Glutathione Beads 4FF 是以高度交联的 4% 琼脂糖凝胶为基质，通过 12 个原子的间隔臂，用化学方法共价结合了还原型谷胱甘肽制作而成。Glutathione Beads 4FF 因其耐压的基质，可以在相对较高的流速下，实现对目的蛋白的纯化，更适合用于工业大规模蛋白的纯化。

表 1 Glutathione Beads 4FF 产品性能

项目	性能
基质	高度交联的 4% 琼脂糖凝胶
配体	通过 12 原子间隔臂偶连的谷胱甘肽
载量	>10 mg GST-tagged protein(40 kDa) /ml 介质
微球粒径	45-165 μm
最大压力	0.3 MPa, 3 bar
pH 稳定范围	3-12
储存缓冲液	含 20% 乙醇的 1xPBS
储存温度	2-8 °C

#### 纯化流程

##### 1. 缓冲液的准备

缓冲液在使用前最好用 0.22um 或者 0.45um 滤膜过滤。

平衡/洗杂液: 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na2HPO4, 1.8 mM KH2PO4, pH 7.4

洗脱液: 用平衡液配制 10mM 还原型谷胱甘肽 (现配现用) 注意: 平衡液和洗脱液中可加入 1-10 mM DTT

##### 2. 样品准备

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

###### 2.1 细菌或酵母表达的蛋白

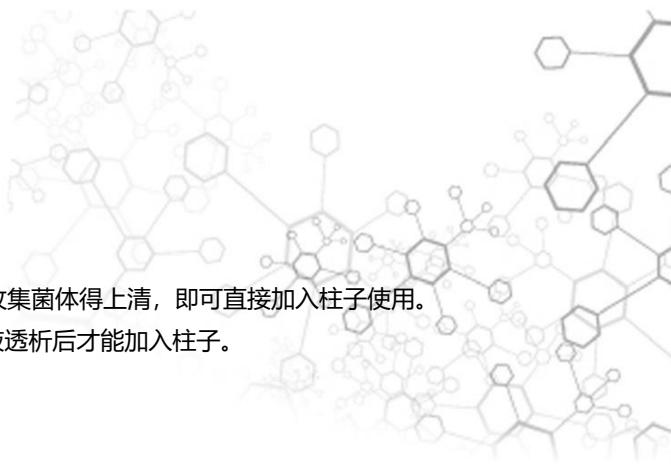
- 1) 挑取单菌落到培养基中, 根据载体使用说明, 加入相应浓度的诱导剂诱导相应的时间。
- 2) 表达结束后, 将培养液转移到离心杯中, 7000 rpm (7500xg), 离心 15 min 收集菌体, 然后按照菌体: 平衡液=1: 10 (W/V) 加入平衡液, 加入终浓度为 1 mM 的 PMSF。加入溶菌酶 (工作浓度为 0.2-0.4 mg/ml, 如果表达的宿主细胞内含 pLysS 或 pLysE, 可以不加溶菌酶, 同时也可加入其他蛋白酶抑制剂, 但不能影响目的蛋白与填料的结合)。
- 3) 将菌体沉淀悬浮起来, (如果菌液浓度高, 也可考虑加入 10 ug/ml RNase A 和 5 ug/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, 10000 rpm (15000xg), 4°C 离心 20-30 min。取上清, 置于冰上备用或-20°C 保存。





兰博利德 LABLEAD

高 新 技 术 企 业



## 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，5000 rpm (3800xg), 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。

## 3. 层析柱的装填

### 3.1 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 4FF 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。

### 3.2 中压层析柱的装填

装柱前根据层析柱直径计算柱子底面积，根据所需装柱高度计算所需介质体积，公式如下：

$$V = 1.15\pi r^2 h \quad (V: \text{所需介质体积 ml}; 1.15: \text{压缩系数}; r: \text{柱管半径 cm}; h: \text{装填高度 cm})$$

**注意：所取悬液体积应为介质体积的两倍，因为介质体积只占悬液总体积的一半，另一半为保护液。**

- 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 1-2 cm 的去离子水。
- 2) 将介质悬浮起来，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，开启泵，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，将分配器置于层析柱中。
- 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。

## 4. 样品纯化流程

### 4.1 孵育法纯化

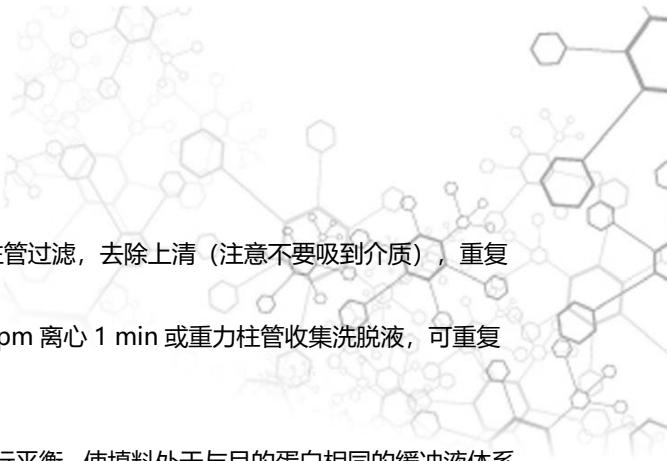
- 1) 根据纯化样品量，取适量 Glutathione Beads 4FF 加入离心管中，1000rpm 离心 1 min, 吸弃上清；也可加入重力柱中，流干保护液。
- 2) 向离心管中加入 5 倍介质体积的平衡液清洗介质，1000rpm 离心 1 min, 吸弃上清；如使用重力柱，则直接在重力柱中清洗，直接重力流干平衡液；重复两次以上。
- 3) 加入样品，封闭离心管或重力柱管，4°C 振荡孵育 2-4h 或者 37°C 孵育 30 min-2h。
- 4) 孵育结束后，1000 rpm 离心 1 min, 吸弃上清，或过滤收集介质，上清保留作为流穿，用于电泳鉴定。





兰博利德 LABLEAD

高 新 技 术 企 业



5) 用 5 倍介质体积的洗杂液清洗介质，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 倍柱体积的洗脱液进行洗脱，室温孵育 10-15 min, 1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管收集洗脱液，可重复 2-3 次。

#### 4.2 重力柱法纯化

1) 将装填好的 **Glutathione Beads 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 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。

#### 4.3 中压层析柱法纯化

Glutathione Beads 4FF 装填好后，可以用各种常规的中低压色谱系统。

1) 将泵管道中注满去离子水。去掉上塞子，将层析柱连接至色谱系统中，打开下出口，将预装柱接到色谱系统中，并旋紧。

2) 用 3-5 倍柱体积的去离子水冲洗出储存缓冲液。

3) 使用至少 5 倍柱床体积的平衡液平衡色谱柱。

4) 利用泵或样品环上样。

**注：样品的粘度增加使得即使上样体积很少，也会导致层析柱很大的反压。上样量不要超过柱子的结合能力。大量的样品体积也可能造成很大的反压，使得进样器更难使用。**

5) 用洗杂液冲洗柱子，直到紫外吸收达到一个稳定的基线（一般至少 10-15 个柱体积）。

6) 使用 5-10 倍柱体积的洗脱液洗脱，收集洗脱液，即目的蛋白组分。

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，再用保护液冲洗 2 个柱体积，然后将介质置于 2-8°C 保存。

#### 5. 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。

#### 6. 填料清洗

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，这时需要对填料进行清洗。

**去除一些沉淀或变性物质，建议使用下面的方法：**

用 2 倍柱体积的 6 M 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。

