

## GST 琼脂糖凝胶 Glutathione Beads

CAT#:RP0081

产品规格: 10 ml

保存条件: 20%乙醇中2-8℃保存。

### 包装清单:

| 产品编号   | 产品名称              | 包装    |
|--------|-------------------|-------|
| RP0080 | Glutathione Beads | 10 mL |
| —      | 说明书               | 1 份   |

### 产品简介:

Glutathione Beads 是以 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。这种特别设计使树脂的纯化效率得到了提高, 具有载量高、特异性好, 尤其适用于在大肠杆菌、昆虫细胞和哺乳动物细胞中表达的 GST 融合表达蛋白。该填料具有很好的物理和化学稳定性, 使用寿命长, 使用方便, 批次重复性好, 可一步分离得到纯度较高的目标蛋白, 纯化条件温和, 可以保证蛋白的活性。

支持物: 4%琼脂糖微球

载量: 15-25 mg GST 标签蛋白/ml 填料

粒径: 45-165  $\mu\text{m}$

### 注意事项

1. 蛋白层析应使用高纯度的试剂和水, 层析前缓冲液应用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后使用。另外为防止柱子阻塞, 上柱前建议将裂解液进行离心, 或者使用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤。
2. GST 融合蛋白与还原型谷胱甘肽的结合比较缓慢, 为获得最大结合量, 上样流速建议为: 0.2-1 ml/分钟 (6 ml 层析柱), 0.5-2 ml/分钟 (12 ml 层析柱)。对于吸附效果不好的样品, 可以先把介质和样品混合, 轻轻振摇 2-4 小时, 再装柱, 用平衡缓冲液进行重新平衡、洗脱等操作, 另外在细菌抽提试剂中添加 5 mM DTT, 可以显著提高 GST 标签结合能力
3. 不同的 GST 融合蛋白取得最佳纯化效果所需还原型谷胱甘肽浓度、洗脱体积和洗脱时间可能有所不同。必要时需对流穿液、洗脱液进行 SDS-PAGE 以及 Western 杂交分析, 以确定最佳纯化条件。
4. GST 融合蛋白以包涵体形式存在时不能与介质结合, 必须先进行变性、复性、透析处理后才能用介质进行纯化。建议优化蛋白表达条件尽量使蛋白可溶性表达。
5. 如后续实验需要除去洗脱液中还原型谷胱甘肽, 可采用超滤或透析的方法。

### 溶液配制

**结合缓冲液 (PBS):** 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH7.4

**洗脱缓冲液:** 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM 还原型谷胱甘肽 (GSH), pH7.4。将 0.1 g 还原型谷胱甘肽 (GSH) 溶于 30 ml 结合缓冲液, 或将 0.25 g 溶

于 75 ml 结合缓冲液中。

**再生缓冲液 1:** 0.1 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 0.1% SDS, pH8.5

**再生缓冲液 2:** 0.1 M Sodium acetate, 0.5 M NaCl, 0.1% SDS, pH4.5

## 操作步骤

### 组装层析柱

1. 将 GST-Agarose 填料混合均匀直至重悬,用吸管移取适量的填料至层析柱中。室温静置 10 分钟,待凝胶与溶液分层后,把底部的出液口打开,让乙醇通过重力作用缓慢流出。

注意:填料的上层是乙醇保护液,将填料与乙醇一起混匀,以每 ml 填料纯化 15-25 mg GST 标签蛋白计算,取需要的填料与乙醇混合液加入层析柱中。

2. 加入 5 倍柱体积的去离子水洗涤,再用 10 倍柱体积的结合缓冲液平衡,平衡结束后即可上样。

注意:柱体积指的是填料的体积。

### GST 融合蛋白的纯化

1. 将层析柱的出口连接上紫外蛋白监测仪,根据紫外蛋白监测仪观察 280 nm 处的吸收值来监控层析柱流出蛋白情况。

2. 上样:将制备的蛋白样品用结合缓冲液等体积稀释后,加入到已平衡好的层析柱中,建议上样流速为: 0.5-1 ml/min (6ml 层析柱), 1-2 ml/min (12 ml 层析柱)。观察 280 nm 吸收情况并收集流穿蛋白。

注意: 1) 样品在上柱前可以离心或 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜过滤。

2) 通过控制加入的菌体裂解液的速度或流出速度来控制柱流速,流速过快会影响柱效。

3. 洗涤:使用 10 倍柱体积的结合缓冲液过柱,洗涤杂蛋白,观察 280 nm 吸收情况并收集杂蛋白。建议洗涤流速为: 0.5-1ml/min (6 ml 层析柱), 1-2 ml/min (12 ml 层析柱)。

4. 洗脱:使用 10-15 倍柱体积的新鲜配制的洗脱缓冲液过柱,洗脱目的蛋白,观察 280 nm 吸收情况并收集目的蛋白。建议洗涤流速为 0.5-1 ml/min (6 ml 层析柱), 1-2 ml/min (12 ml 层析柱)。

5. 蛋白检测:分别取等量的流穿液,洗涤液和目的蛋白洗脱液进行 SDS-PAGE 以分析蛋白的层析情况。

6. 洗脱后,依次用 3-5 倍柱体积的结合缓冲液和 3-5 倍柱体积的去离子水洗涤填料,再用 2-3 倍柱体积的 20%乙醇洗涤乙醇要将填料浸没), 4°C 保存。

### 柱再生

当填料使用多次后,结合效率会有下降,可用以下方法再生,提高填料的使用寿命和蛋白质的结合效率。

1. 使用 5 倍柱体积的再生缓冲液 1 洗涤填料,而后用 5-10 倍柱体积超纯水洗涤。

2. 使用 5 倍柱体积的再生缓冲液 2 洗涤填料,而后用 5-10 倍柱体积超纯水洗涤。

3. 保存:使用 2-3 倍柱体积的 20%乙醇洗涤,将层析柱的头尾密封后(乙醇要将填料浸没)4°C 保存。

4. 再次使用时加入 5 倍柱体积的去离子水将乙醇洗涤后,使用 10 倍柱体积的结合缓冲液平衡填料,平衡结束后即可上样。