

# GST标签蛋白纯化琼脂糖凝胶

Glutathione Agarose Resin

本产品 4°C 运输；保存于 4°C，禁止产品冻结，长期存放请保证试剂管竖立向上，凝胶浸没于保护液中，保质期 24 个月。

## 货号规格

货号	规格
YJ105	1 mL×10

## 产品简介

本产品可用于纯化各种表达系统融合表达的 GST 重组蛋白，其是以由高度交联的 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还原型谷胱甘肽制作而成。

## 产品参数

项目	参数
基质	高度交联的 4% 琼脂糖微球
配体	谷胱甘肽
载量	> 30 mg GST 蛋白
粒径	45~135 μm
耐压流速	80~150 cm/h (0.3 MPa, 3 bar)
浓度	凝胶体积占悬浮液体积的 50%
储存缓冲液	含 20% 乙醇的 1×PBS

## 自备试剂

缓冲液	推荐配方
洗脱缓冲液	50 mM Tris-HCl, 10 mM reduced glutathione, pH 8.0

注：① 所用去离子水和缓冲液在使用前建议用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤，减少杂质，以提高蛋白纯化效率和防止堵塞纯化柱。

② 上述缓冲液中可加入 1~10 mM DTT，以提高纯化效率。

## 操作步骤

### 样本处理（以大肠杆菌表达系统为例）

- 离心收集大肠杆菌 (4°C, 4,000×g, 30 min)，弃上清；
- 用冷 1×PBS (货号：PS110) 重悬细胞，如果需要，可加入适量的添加剂，如非离子去污剂 (NP-40) 或蛋白酶抑制剂 (货号：GRF101)；



3. 用超声波破碎法在冰上破碎菌体,直到样品破碎完全;
4. (可选)如果裂解物太过粘稠,可以加入 RNase A(终浓度 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )和 DNase I(终浓度 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )并在冰上孵育 10~15 min;
5. 离心收集上清 (4 $^{\circ}\text{C}$ , 12,000 $\times g$ , 20 min);
6. SDS-PAGE 分析 GST 融合蛋白的含量及可溶性;

#### 纯化重组 GST 融合蛋白

7. 轻轻重悬 **GST 标签蛋白纯化琼脂糖凝胶**,吸取适量加入重力柱中,用 10 倍柱体积的冷 1 $\times$ PBS(货号: PS110)平衡 GST 琼脂糖凝胶;
8. 将步骤 5 制备好的含有 GST 融合蛋白的上清液加入到纯化柱中,流速控制为 0.5~1 mL/min;
9. 蛋白上清液全部流出纯化柱后,立刻加入 1 $\times$ PBS 清洗纯化柱,所需量大约为柱体积的 20 倍或者直到流出液的 A280 值达到最低且稳定;
10. 用 10~15 倍柱体积的现配 **洗脱缓冲液** 以 0.5~1 mL/min 的流速洗脱,收集洗脱液。或者根据流出液 A280 值判断,当数值陡然上升时开始接收洗脱液,直到 A280 数值降至最低且稳定时,停止收集。后续可根据目的蛋白的性质和用途,4 $^{\circ}\text{C}$ 透析到 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 或者 1 $\times$ PBS, pH 7.4 中,以去除游离的谷胱甘肽。

#### 凝胶再生及储存

**GST 标签蛋白纯化琼脂糖凝胶** 可以重复使用,但随着使用次数增多,非特异性结合的蛋白聚集往往会造成流速和蛋白结合载量的下降,此时便需要对琼脂糖凝胶填料进行清洗。

11. 使用 5 倍纯化柱体积去离子水清洗琼脂糖凝胶填料;
12. 使用 2 倍柱体积的 6 M 盐酸胍溶液进行清洗;
13. 使用 5 倍柱体积去离子水清洗填料;
14. 使用 3~4 倍柱体积 70% 乙醇或 2 倍柱体积的 1% Triton X-100 清洗填料;
15. 使用 5 倍柱体积去离子水清洗填料,即完成琼脂糖凝胶填料再生。

注: 填料再生后,可以立即使用,如不立即使用,需要将填料悬浮于等体积的 20% 乙醇中,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

## 注意事项

1. 琼脂糖磁珠应保存在储存溶液中,防止干燥;
2. 为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作;
3. 本产品仅限科研使用。



## 常见问题解析

问题描述	可能原因	解决方案
GST融合蛋白的产量低或无法检测到	融合蛋白形成包涵体	采用低温 (16~25°C) 培养细胞, 或者诱导过程中降低诱导剂的终浓度至 1 mM, 或者缩短诱导时间  纯化前需要完全融解和复性。将裂解液与GST标签蛋白纯化琼脂糖凝胶在摇床上轻摇2个小时或者更长时间(过夜), 充分结合
	融合蛋白可能失活	采用温和的超声破碎条件或者其它的裂解条件, 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
	融合蛋白不能有效地从树脂上洗脱下来	延长洗脱时间, 或者增加洗脱缓冲液中还原性谷胱甘肽的浓度至 15 mM 或者更高
		调节洗脱缓冲液的 pH 值至 8.0~9.0  在洗脱缓冲液中加入 Triton X-100(终浓度 0.1%)、辛基-葡萄糖苷(终浓度 2%) 或者 NaCl(终浓度 0.1~0.2 M)
洗脱缓冲液中有较多杂带	融合蛋白被蛋白酶降解	在裂解步骤或漂洗步骤加入适量的蛋白酶抑制剂
	一些宿主蛋白, 比如伴侣蛋白, 可能会和融合蛋白互相作用	在漂洗缓冲液中加入 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, 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 50 mM Tris-HCl) 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它的裂解条件
	有些蛋白会与融合蛋白或树脂发生非特异性结合	优化漂洗条件: 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; 优化漂洗缓冲液中的盐浓度也可以降低非特异性吸附