

产品 GSTSep Glutathione 4FF

产品描述

GSTSep Glutathione 4FF是一种在填料上共价结合了还原型谷胱甘肽的预装柱,主要应用于GST标记蛋白的捕获和纯化。HisBond NTA- μ Sphere洗杂蛋白推荐不加还原型谷胱甘肽,洗脱液推荐加入10mM还原型谷胱甘肽(现配现用)。预装柱具有标准接口,可以适配商品化的各类中压色谱系统,如AKTA等,方便客户操作。

项目	性能
粒径	45-165 μ m
载量	>100mg GST 蛋白(40 kDa)基质
最大压力	0.1 MPa, 1 bar
pH 稳定范围	3-12

纯化流程

1. 缓冲液的准备

缓冲液在使用前最好用 0.22 μ m 或者 0.45 μ m 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 10 mM 还原型谷胱甘肽(现配现用)

注意: 1、平衡液和洗脱液中可加入 1-10 mM DTT。

2、注意PH值,加谷胱甘肽会变酸(有可能达到PH4.0),PH调整到7.4(有好的洗脱效果)

2. 样品准备

将菌体破碎离心,取上清(有时为防止GST融合蛋白被蛋白酶部分降解,会加入蛋白酶抑制剂PMSF)。

3. 样品纯化

(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。再折断下口,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存储缓冲液。

(3)使用至少5倍柱体积的平衡液平衡色谱柱。

(4)利用样品泵或样品环上样。

(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)用洗脱液采用等度或线性梯度洗脱。等度洗脱中,通常5倍柱体积洗脱液就足够了。

梯度洗脱可以用20倍柱体积或更多,来分离不同结合强度的蛋白质。

(7)依次使用3倍柱体积的平衡液和5倍柱体积的去离子水平衡填料,最后再用5倍柱体积的含 20%乙醇的 1XPBS平衡,然后保存在含 20%乙醇的 1XPBS中,置于2-8°C,防止填料被细菌污染。

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。

在位清洗

当填料使用过程中发现反压过高或者填料上面出现明显的污染时,需要进行在位清洗操作(Cleaning-in-Place,CIP)。建议按照下面操作去除填料上残留的污染物,如沉淀蛋白、疏水蛋白和脂蛋白等。

a. 去除强疏水结合的蛋白,脂蛋白和脂类

方案一:使用30%异丙醇清洗5-10个柱体积,接触时间为15-20 min 可以去除此类污染物。然后,再使用10倍柱体积的去离子水清洗。

方案二:使用含有0.1-0.5%非离子去污剂的0.1M 醋酸溶液,接触时间为1-2 h。去污剂处理后,需要使用70%的乙醇清洗5个柱体积,以彻底去除去污剂。最后使用10倍柱体积的去离子水清洗。

方案三:使用0.1M 或0.5M NaOH 溶液冲洗填料3个柱体积,然后用10-15倍柱体积的去离子水清洗。

b. 去除离子作用结合的蛋白

使用1.5 M NaCl溶液清洗10-15 min。然后,再使用去离子水清洗10个柱体积。清洗好的柱子可再用含 20%乙醇的 1XPBS冲洗2个柱体积,置于2-8°C保存。

问题及解决方案

问题	原因	推荐的解决方案
柱子反压过高	填料被堵塞	对填料进行在位清洗 裂解液中含有微小的固体颗粒,建议上柱前使用滤膜(0.22或0.45 μ m)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。
	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。
洗脱组分中 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。
	目的蛋白结合过强,不容易洗脱下来	适当增加谷胱甘肽的浓度洗脱。
蛋白降解		在4°C下进行纯化操作
		菌体破碎时添加一些蛋白酶抑制剂。
洗脱组分不纯 (含有多种蛋白)	洗杂操作不彻底	增加洗杂液体积。
	目的蛋白被部分降解	GST融合蛋白被蛋白酶部分降解,加入蛋白酶抑制剂PMSF
上样过程中 蛋白发生沉淀	操作温度太高	4°C下进行上样。
	蛋白发生聚集	在样品和所有的缓冲液中添加稳定剂,如0.1%的Triton X-100或者Tween-20。