

纯化方法的问题解决

以下解决问题的指南指出了对于大多数纯化方法的普遍问题，对于特别的纯化方法的问题也有提及，这种情况下会指出相应的纯化方法。

问题	可能原因	解决方法
GST 标签蛋白不结合柱子或结合非常弱	GST 标签蛋白被机械裂解的方法变性（比如超声）。过分的裂解会使标签蛋白变性，阻止其结合。	在裂解过程中，用温和的机械/化学裂解条件。裂解的条件必须依照经验来决定。
	GST 标签蛋白在样品中有聚集，导致沉淀	在细胞裂解前加入 DTT，在缓冲液中也加入 DTT。1-20mM 的 DTT 会显著增加某些 GST 蛋白的结合。
	标签蛋白的浓度过低	浓缩样品。结合能力是浓度依赖的。低表达量的蛋白可能不会像高表达量蛋白那样有效地结合柱子。因此，浓缩样品会提高结合。
	标签蛋白可能改变了 GST 的构象，因此降低了 GST 标签蛋白的结合能力。	检测所使用的 pGEX 载体中 GST 的结合。准备带有所使用的 pGEX 的细胞超声裂解物，检测其与柱材的结合。如果结合的很好，则可能是标签蛋白改变了 GST 的构象，因此降低了 GST 标签蛋白的亲合力。可以通过降低结合的温度到 4° C 限制洗涤来改善结果。
	平衡时间太短	确认柱材至少用 5 倍柱体积的 pH6.5 到 8.0 的缓冲液平衡过（比如 PBS）。
	GST 标签蛋白在 pH 值低于 6.5 和高于 8 时结合效率低	在净化好的样品上样前用 pH6.5 到 8.0 的缓冲液平衡过（比如 PBS）。
	GSTrap 柱：柱子需要清洗	根据标准的清洗步骤清洗柱子（见附录 2）。如果 GSTrap 柱已经用过几次了，可能需要换用新柱。
	Glutathione Sepharose 柱材使用次数过多	使用新的 Glutathione Sepharose 柱材（清洗过程请见附录 2）
	样品上样过程中的流速过高	降低在上样时的流速。影响 GST 标签蛋白结合的一个重要参数就是流速。由于 GST 与谷胱甘肽相对慢的结合，在样品上样过程中保持低流速以获得最大结合能力很重要。
	在 ÄKTaprime plus 上的 GSTrap 柱：柱子或系统被堵住了，导致高压力和无结合。	柱子堵住了：根据说明书清洁柱子，确认样品已经离心或用 0.45µm 的滤膜过滤过了。 系统堵住了：将柱子换成一段管子。如果压力高于 0.3MPa，根据手册清洗系统
	在 ÄKTaprime plus 上的 GSTrap 柱：样品不结合	检测是否使用了正确的柱子。 检测流入管是否接入了正确的流入端口。 检测缓冲液的组成和 pH 值是否正确。检测样品是否已经被调节到适合结合缓冲液的条件。

GST 标签蛋白不能被高效的洗脱	洗脱缓冲液的体积不够	增加洗脱缓冲液的体积。有些情况下，尤其是柱上酶切有标签蛋白时，需要更大体积的缓冲液来洗脱标签蛋白。
	洗脱的时间不够	通过降低洗脱过程中的流速来增加洗脱时间。 对于GSTrap柱，为了获得最好的结果，在样品上样时，用0.2到1ml/min的流速（1ml HiTrap柱），0.5到5ml/min的流速（5ml HiTrap柱）。对于离心方法，降低洗脱过程中的离心速度。
	谷胱甘肽的浓度不够	增加洗脱缓冲液中谷胱甘肽的浓度：本方案中建议的10mM浓度对于大多数应用来说足够了，但是也存在例外。尝试使用50mM Tris-HCl，20-40mM 还原型谷胱甘肽，pH8.0作为洗脱缓冲液。
	洗脱缓冲液的pH过低	增加洗脱缓冲液的pH值：将pH增加到8-9会增强洗脱而不用提高洗脱所用谷胱甘肽的浓度。
	洗脱缓冲液的离子强度过低。	增加洗脱缓冲液中的离子强度，在洗脱缓冲液中加入0.1-0.2M的氯化钠也会使结果变好。
	洗脱缓冲液中的谷胱甘肽被氧化了	使用新鲜的洗脱缓冲液。 加入DTT。
	非特异的疏水相互作用导致蛋白和柱材非特异的结合或聚集，从而阻止了标签蛋白的溶解和洗脱。	向洗脱缓冲液中加入非离子去垢剂。加入1%的TritonX-100或2%的n-octylglucoside可以显著提高某些GST标签蛋白的洗脱。
电泳或蛋白质免疫印迹检测发现多条条带	分子量为70 000 的蛋白与GST标签蛋白共纯化	分子量为70 000 的蛋白可能是大肠杆菌dnaK基因的产物。该蛋白参与大肠杆菌中蛋白质折叠。有报道这种相互作用可以通过上样前在50mM Tris-HCl，2mM ATP，10mM MgSO ₄ ，pH7.4中37° C温浴10分钟而破坏。或者把有标签蛋白通过ATP-agarose或相似的纯化介质或进行离子交换层析来除去。
	标签蛋白被蛋白酶部分降解	加入蛋白酶抑制剂。多条条带可能是由于目的蛋白被蛋白酶部分降解的结果。在裂解溶液中加入1mM PMSF可能会使结果变好。一种无毒的水溶性的PMSF替代物是AEBSF，Roche Biochemicals的商品名为Pefabloc SC。注：丝氨酸蛋白酶抑制剂必须在使用凝血酶或凝血因子Xa前除去。Prestission Protease不是一种经典的丝氨酸蛋白酶。经GE Healthcare检测，它对很多蛋白酶抑制剂不敏感。PMSF有毒，有急性作用。如果可能的话使用Pefabloc SC。

	在宿主细菌中的蛋白降解	用一种蛋白酶缺失型宿主：多条带可能是在宿主细菌中蛋白酶切造成的。如果是这种情况，或许需要蛋白酶缺陷型菌株（比如lon-或ompT）。大肠杆菌BL21随pGEX载体提供。这种菌株是ompT和lon缺陷型菌株。
	在机械裂解过程中细胞破碎	降低裂解时间：细胞裂解表面上是使悬液部分澄清，可以通过镜检测。机械裂解前加入溶菌酶（0.1倍体积的10毫克/毫升溶菌酶溶液，溶菌酶保存在25mM Tris-HCl,pH8.0）可能会使结果变好。避免发泡，因为这可能使标签蛋白变性。过分裂解也会导致宿主细胞蛋白和GST标签蛋白共纯化。
	分子伴侣可能被共纯化了	包括额外的纯化步骤：多余的条带可能由于共纯化一些分子伴侣所造成。这些分子伴侣参与大肠杆菌中新生成的蛋白的正确折叠。这些包括，但不仅仅是：DnaK（分子量70 000）DnaJ（分子量37 000）GrpE（分子量40 000）GroEL（分子量57 000）GroES（分子量10 000）。一些从这些共纯化的蛋白中分离GST标签蛋白的方法已经发表。
	抗体和很多种大肠杆菌中的蛋白反应	抗体和大肠杆菌蛋白交叉反应：取决于抗GST抗体的来源。它可能包含一些抗体，这些抗体与标签蛋白样品中的大肠杆菌蛋白能够反应。通过和大肠杆菌的超声裂解物反应来除掉那些能够交叉反应的抗体。GE Healthcare的GST抗体已经和大肠杆菌蛋白进行过交叉吸附，并检测证明其在蛋白质免疫印迹中没有非特异条带。
目的蛋白酶切后电泳检测发现多条条带	蛋白酶切发生在宿主细菌内	检测条带何时出现：确定多余的条带在Precision Protease，凝血酶，凝血因子Xa切割前不存在。这些条带可能是在宿主细菌中降解的结果。 目的蛋白可能含有Precision Protease，凝血酶，凝血因子Xa的切割位点，检查序列。细节请参见《GST基因融合系统手册》。