



## 谷胱甘肽琼脂糖凝胶 HP

pGEX 系列表达载体表达的融合蛋白与谷胱甘肽 S-转移酶结合，因此可以使用谷胱甘肽-琼脂糖凝胶填料进行纯化。pGEX是一类以谷胱甘肽（ $\gamma$ -谷胱甘肽半胱胺酰甘氨酸）作为底物，通过形成硫醇尿酸失活毒性小分子的酶。由于 GST 对底物的亲和力是亚毫摩尔级的，因此谷胱甘肽-琼脂糖凝胶亲和层析填料纯化 GST 融合蛋白的效率很高。可以用含游离谷胱甘肽的缓冲液洗脱结合 GST 融合蛋白

### 1 性能参数：

基质	4%的交联琼脂糖凝胶
配体密度	0.8-3 mg 谷胱甘肽/g填料
吸附载量	5-10 mg谷胱甘肽-S-转移酶/ml填料
平均粒径	34 $\mu$ m
最大流速	200 cm/h
pH范围	3-12
化学稳定性	0.1 M NaOH
保存温度	+4-8°C
保存液体	20%乙醇

\*检测条件： 层析柱 16mm $\times$ 200mm \* 柱床高 5cm, 25°C

### 2 使用

#### 2.1 缓冲液制备

所有缓冲液需要用 0.45 $\mu$ m 的过滤器过滤。常用下面的缓冲液，适用于大部分 GST 融合蛋白： 结合缓冲液：PBS, pH 7.3

洗脱缓冲液：50mM Tris-HCl, 10mM 还原型谷胱甘肽, pH 8.0

#### 2.2 样品制备

在将样品上样之前，应将样品用 0.45 $\mu$ m 过滤器进行过滤或离心。如果样品太粘稠，应用结合缓冲液稀释，以防止堵塞色谱柱。

#### 2.3 柱纯化

##### 2.3.1 装柱

(1) 让所有的材料和试剂均平衡至层析实验的温度。配制缓冲液，对所有的缓冲液进行脱气处理。

(2) 检查层析柱所有部件，特别是过滤网，密封圈，螺旋塞是否紧密，玻璃管是否干净和完整。

(3) 根据需要量取相应量的凝胶，用去离子水清洗掉 20%乙醇。



(4) 将柱子底端用水或缓冲液润湿并保持一小段液位，务必使底端无气泡。

(5) 用玻璃棒引导匀浆沿着柱内壁一次性倒入柱内，注意勿使产生气泡。打开柱子出液口，使凝胶在柱内自由沉降，连结好柱子顶端柱头。

(6) 打开蠕动泵，让缓冲液用使用时流速的 1.33 倍的流速流过，使柱床稳定（注意压力不要超过填料最大耐压）。

### 2.3.2 平衡色谱柱

用5-10个柱体积的结合缓冲液平衡该柱，直到流出液电导和pH不变。

### 2.3.3 上样

(1) 样品用平衡液配制，样品一定要离心或过滤后上样。盐浓度太大的样品需要处理后再上样。

(2) 一般情况是让目标产品结合在柱子上，用平衡液洗去杂质和没有结合的蛋白，再选择一种洗脱液洗下目标产品。

### 2.3.4 洗脱

洗脱缓冲液使用阶梯梯度或线性梯度洗脱。对于洗脱步骤，5个柱体积的洗脱缓冲液通常就足够了。对于线性梯度洗脱，适当增加洗脱步骤。

注意：

1) 影响 GST 标记蛋白或其他谷胱甘肽结合蛋白与谷胱甘肽琼脂糖 HP 结合的最重要的参数之一是流速。由于 GST 和谷胱甘肽之间的相对较慢的结合动力学，重要的是在样品使用期间保持低流速以获得最大结合能力。蛋白质特性，pH 和温度是可能影响结合能力的其他因素。

2) 用于洗脱的体积和时间可随标记的蛋白质而变化。可能需要更高浓度的谷胱甘肽的额外洗脱。如果需要，应使用 SDS-PAGE 与 Western 印迹组合监测洗涤和洗脱物质中的 GST 融合蛋白。

3) GST 标记的蛋白质的浓度也可以通过标准显色方法（例如 Lowry, BCA 和 Bradford 测定）来测定。

## 2.4 手动简易纯化

1) 确定纯化所需的谷胱甘肽-琼脂糖凝胶 HP 的体积。注意：谷胱甘肽-琼脂糖凝胶 HP 保存在 20%乙醇中。

2) 轻轻摇动谷胱甘肽-琼脂糖凝胶 HP 的瓶子，使填料混合均匀，转移到合适的离心管中。

3) 500×g 离心 5 分钟沉淀谷胱甘肽-琼脂糖凝胶 HP。小心倒去上清液。

4) 通过向每 1ml 浆液中加入 5ml 结合缓冲液来洗涤谷胱甘肽-琼脂糖凝胶 HP。

5) 500×g 离心 5 分钟沉淀填料，小心倒去上清液。

6) 再次重复步骤 4 和 5，反复 3-5 次。

7) 将样品加入到平衡好的谷胱甘肽-琼脂糖凝胶 HP 中并孵育至少 30 分钟。



- 8) 使用移液管或量筒将混合物转移到合适的容器/管中。
- 9) 500×g 离心 5 分钟沉淀填料，小心地倒出上清液并保存，以用于测量与填料的结合率，做 SDS-PAGE。
- 10) 通过向每 1ml 浆液中加入 5ml 结合缓冲液来洗涤谷胱甘肽琼脂糖凝胶 HP。 反转混合。
- 11) 500×g 离心 5 分钟沉淀填料，小心倒出上清液并保存，以用于 SDS-PAGE 分析。
- 12) 重复步骤 10 和 11 两次，共洗涤三次。
- 13) 通过每 1ml 谷胱甘肽琼脂糖HP 浆液加入 0.5ml 洗脱缓冲液洗脱结合的蛋白，在室温下孵育 5-10 分钟。反转混合。
- 14) 500×g 离心 5 分钟沉淀填料，小心倒出上清液并保存。
- 15) 重复步骤 13 和 14 两次，共洗脱三次，根据结果分别检查三种洗脱物纯化的蛋白质。

### 3 在位清洗

如果填料似乎失去结合能力，则可能是由于沉淀，变性或非特异性结合蛋白的积累。

去除沉淀或变性物质：用 2 倍柱体积的 6M 盐酸胍洗涤，然后立即用 5 倍柱体积的 PBS (pH7.3) 洗涤。

### 4 保存

2-8℃密闭保存。使用完的填料，用纯水彻底冲洗，最后保存在20%乙醇中，4℃保存。

### 5 注意事项：

(1) 上样之前，样品必须经过膜过滤及去除色素，否则杂质及色素会被吸附到填料上，影响填料的正常使用。所有的缓冲液均需要用 0.45um 的过滤器过滤。

(2) 在使用过程中，避免使用高浓度的强酸强碱，酸和碱的浓度应低于0.1摩尔。碱会使流速变慢。

(3) 不同的样品，吸附和洗脱方法不相同，可以根据相关的文献进行。