



## 谷胱甘肽琼脂糖凝胶 4B

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%的琼脂糖凝胶
配体	谷胱甘肽和10个C链
配体密度	200-400 $\mu\text{mol}$ 谷胱甘肽/g填料
吸附载量	> 5mg谷胱甘肽-S-转移酶/ml填料
介质颗粒大小	45-165 $\mu\text{m}$
最大流速	75cm/h
pH范围	4-13
化学稳定性	0.1 M NaOH
保存温度	+4-8 $^{\circ}\text{C}$
保存液体	20% 乙醇

\*检测条件: 层析柱 16mm $\times$ 200mm \*柱床高 5cm, 25 $^{\circ}\text{C}$

### 2 使用

#### 2.1 缓冲液制备

用于缓冲液制备的水和化学品应具有高纯度。我们建议在使用前通过 0.45 $\mu\text{m}$  的过滤器过滤缓冲液。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 (140mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.8mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.3)

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

注意: 结合和洗脱缓冲液中可以含 1-10 mM DTT, 以提高纯度, 但是可能导致较低的



靶蛋白产量。

## 2.2 样品制备

在将样品上样之前, 应将样品用 0.45um 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达到室温。配制初始缓冲液(平衡液)和洗脱缓冲液。
- (2) 根据柱子大小取所需量的凝胶, 用去离子水清洗掉 20% 乙醇, 用初始缓冲液(按凝胶: 缓冲液=3: 1 的比例)配成匀浆。
- (3) 将柱内及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。
- (4) 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。
- (5) 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配。
- (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

用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 4B 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流速低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) 可以通过测量 280nm 处的吸光度来估计 GST 标记的蛋白质的浓度。GST 标签可以使用转换近似:  $A_{280} \sim 1$  对应于  $\sim 0.5\text{mg} / \text{ml}$ 。
- 4) 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。如果使用 Lowry 或 BCA 测定, 则样品必须首先使用脱盐柱进行缓冲液交换或者用 PBS 透析以除去谷胱甘肽, 这可能干扰蛋白质测量。Bradford 方法可以在谷胱甘肽的存在下使用。
- 5) 谷胱甘肽-琼脂糖凝胶 4B 的重复使用取决于样品的性质, 并且只应使用相同的样品进行, 以防止交叉污染。

## 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 4B 的体积。注意: 谷胱甘肽-琼脂糖凝胶 4B 保存在 20% 乙醇中
- 2) 轻轻摇动谷胱甘肽-琼脂糖凝胶 4B 的瓶子, 使填料混合均匀。
- 3) 使用移液管或量筒除去足够的浆液, 并转移到合适的管中。
- 4)  $500 \times g$  离心 5 分钟沉淀谷胱甘肽-琼脂糖凝胶 4B。小心倒去上清液。
- 5) 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 4B。反转混合。
- 6)  $500 \times g$  离心 5 分钟沉淀填料, 小心倒去上清液。
- 7) 再次重复步骤 5 和 6, 反复 3-5 次。
- 8) 将样品加入到平衡好的谷胱甘肽-琼脂糖凝胶 4B 中并孵育至少 30 分钟, 使用温和的搅拌。
- 9) 使用移液管或量筒将混合物转移到合适的容器/管中。
- 10)  $10.500 \times g$  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, 通过 SDS-PAGE。
- 11) 通过向每 1ml 浆液中加入 5ml 结合缓冲液来洗涤谷胱甘肽 Sepharose 4B。反转混合。
- 12)  $12.500 \times g$  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。
- 13) 重复步骤 11 和 12 两次, 共洗涤三次。
- 14) 通过每 1ml 谷胱甘肽琼脂糖 4B 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
- 15)  $500 \times g$  离心 5 分钟沉淀填料, 小心倒出上清液并保存。
- 16) 重复步骤 14 和 15 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。



**注意:**

- 1) 由于 GST 和谷胱甘肽之间相对较慢的结合动力学, 重要的是允许足够的时间获得最大的结合能力。结合效率可以在不同的 GST 标记蛋白之间显著不同。
- 2) 用于洗脱的体积和时间因蛋白质而异。有些蛋白可能需要更高浓度的谷胱甘肽进行洗脱。
- 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 测定法)测定。如果使用 Lowry 或 BCA 测定, 则样品必须首先使用脱盐柱进行缓冲液交换, 或者用 PBS 透析以除去谷胱甘肽, 这可能干扰蛋白质测量。Bradford 方法可以在谷胱甘肽的存在下使用。
- 4) 谷胱甘肽-琼脂糖凝胶 4B 的重复使用取决于样品的性质, 并且只应使用相同的样品进行, 以防止交叉污染。

### 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。

(1) 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。

(2) 去除疏水性结合物质: 用 3-4 个柱体积的 70%乙醇或 2 个柱体积的 1%Triton<sup>TM</sup> X-100 洗涤, 紧接着是 5 个柱体积的 pH7.3 的 PBS。

### 4 保存

在20%乙醇中, 4℃下长期保存。

**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。
- 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。