



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（ γ -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
配体密度	200-400 μmol 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 μm
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

所有缓冲液需要用 0.45 μm 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 μm 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 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 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，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 4B。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 4B。

(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的谷胱甘肽-琼脂糖凝胶 4B 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 Sepharose 4B。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 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。

(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。