



此说明仅限参考

## GST 琼脂糖凝胶 使用说明

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:

类型	GST琼脂糖凝胶4B	GST琼脂糖凝胶4FF	GST琼脂糖凝胶4B
吸附载量	5mg-10谷胱甘肽-S-转移酶/ml	5-10 mg谷胱甘肽-S-转移	5-10 mg谷胱甘肽-S-转移
介质颗粒大小	45-165 $\mu$ m	45-165 $\mu$ m	平均34 $\mu$ m
最大流速	75 cm/h	100 cm/h	50 cm/h
pH范围	4-12	4-12	4-12
化学稳定性	0.1 M NaOH	0.1 M NaOH	0.1 M NaOH
保存温度	4-8 $^{\circ}$ C	4-8 $^{\circ}$ C	4-8 $^{\circ}$ C

\*检测条件: 层析柱 10mm $\times$ 200mm \*柱床高 5cm, 25 $^{\circ}$ 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 A: PBS, pH 7.3

洗脱缓冲液 B: 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 (注意: 填料不可以超声脱气)。

(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。

### 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。

## 2.4 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) 不建议纯化包涵体。

## 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

4-8°C 密闭保存。使用完的填料，用纯水彻底冲洗至少 5 个柱体积，最后保存在 20% 乙醇中，4-8°C 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。