



此说明仅限参考

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 (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 μ 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 $^{\circ}$ C
保存液体	20%乙醇

*检测条件: 层析柱 16mm $\times$ 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 μ 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 μ 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

4-8℃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。

产品订购相关信息

产品货号	产品名称	纯度/规格	包装
HA-0742-10ml	谷胱甘肽-琼脂糖凝胶H.P.	国产	10ml
HA-0742-50ml	谷胱甘肽-琼脂糖凝胶H.P.	国产	50ml

瑞达恒辉所有产品仅用作科学研究,不得用于其他用途!销售产品行为均适用于我司官网所列用户协议条款。