

# 绿色荧光蛋白GFP的原核蛋白表达、纯化及性质鉴定（2）

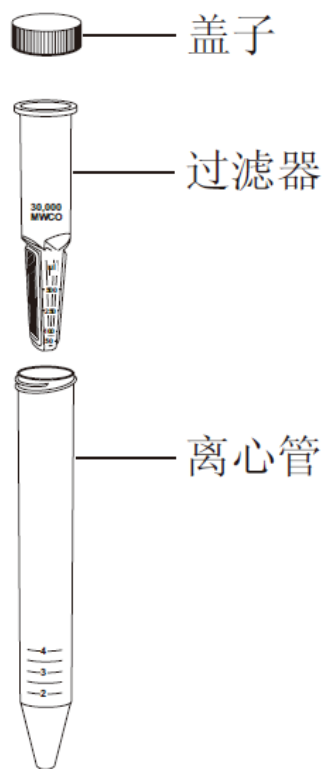
实验内容：

1. 超滤浓缩
2. 纯化后GFP样品的凝胶过滤脱盐
3. 蛋白质含量测定

# 超滤浓缩法

- 浓缩是从低浓度的溶液**除去水或溶剂**，变为高浓度溶液的过程。生物大分子在制备过程中由于过柱纯化等操作使**样品变得很稀**，为了保存和鉴定等目的，往往需要进行浓缩。
- 超滤：是一种**加压膜分离技术**，即在一定的压力下，使小分子溶质和溶剂穿过一定孔径的特制薄膜，而使大分子**溶质不能透过**，留在膜的一边，从而使**大分子物质得到浓缩**。
- **优点**：超滤浓缩的优点是操作简便、成本低，**不需添加任何化学试剂**，尤其是超滤技术的**实验条件温和**，与蒸发、冰冻干燥相比**没有相的变化**，而且不引起温度、pH的变化，因而可以防止生物大分子的变性、失活和自溶。
- **应用**：在生物大分子的制备技术中，超滤主要用于**生物大分子的脱盐、脱水和浓缩等**。

# 超滤离心法



离心超滤管 (Millipore公司,  
Amicon Ultra-4,10K)

- 超滤离心法是利用超滤离子装置，即**超滤离心管**，对样品进行超滤浓缩的实验方法。
- 超滤离心管具有**快速超过滤功能**，能够达到较高的**浓缩系数**，易于从稀释液和复杂的样本组合进行浓缩液回收。其竖式设计以及可用的滤膜表面积能提供快速的样本处理和较高的样本回收率，并能进行80倍浓缩。

# 实验器材及溶液

- 仪器：离心机、移液器
- 耗材：离心超滤管 (Amicon Ultra-4,10K)
- 超滤缓冲液：50 mmol/L Tris-HCl, pH7.9, 5%甘油

**注意：超滤缓冲液与凝胶过滤实验的脱盐缓冲液配方一样，  
超滤浓缩实验的缓冲液使用前也需要过滤。**

# 超滤离心管的预清洗

- Amicon® Ultra-4超滤离心管使用前是干燥的，使用前加入超纯水，7000 g离心1 min，使水完全过膜，冰浴或冰箱里预冷几分钟。然后将水倒出，即可加入蛋白质溶液。操作要轻，加入蛋白质溶液前，超滤管需要插在冰上预冷。
- 注意：
  - 1) Amicon Ultra超过滤装置中的滤膜一旦润湿后应避免再次干燥。若在预清洗后没有立即使用，则让液体保留在滤膜上，直到使用该装置为止。
  - 2) 如果用的是上个班用过的超滤管，此步可跳过。
  - 3) 超滤浓缩实验所有涉及离心的步骤，不要盖转头上的消音盖，直接离心。

# 实验步骤

- 1. Ni柱亲和纯化得到的GFP样品溶液先用量筒测量体积，然后将其加入到Amicon® Ultra超滤管中；
- 2. 将盖好盖子的超滤管对称放入离心转子中（**注意配平**），需将超滤管方向设置成使滤膜板朝上；
- 3.  $7\ 000\times g$ ， $4^{\circ}\text{C}$ 离心3 min，离心结束，取出超滤管，用移液器轻轻洗吹混匀（**防止绿色荧光蛋白GFP离心浓缩过程中聚集沉淀**），然后继续 $7\ 000\times g$ ， $4^{\circ}\text{C}$ 离心3 min浓缩，直至所有样品溶液浓缩至终体积为小于等于1 mL（**约800  $\mu\text{L}$ 即可**）；
- 4. 快速用移液器将浓缩后的样品取出至1.5 mL离心管；

# 实验步骤

- 5. 加入400  $\mu\text{L}$ 的超滤缓冲液到超滤管中，洗吹冲洗超滤管底部并将液体移至步骤4的1.5 mL离心管；
- 6. 合并后的样品用于凝胶过滤脱盐实验；
- 7. 在凝胶脱盐柱上样前，对样品离心（20 000 $\times g$ ，4 $^{\circ}\text{C}$ ，10 min）。

# 超滤离心管使用后的处理和保存

- 使用完的浓缩管，立即加入3 mL 的超滤缓冲液（此缓冲液与浓缩样品的缓冲液一致），清洗超滤离心管，用移液器吸弃超滤离心管中的超滤缓冲液。
- 向内管中加入3 mL的超纯水，7 000×g离心5 min。
- 上交超滤离心管至助教处。



# 注意事项

- Amicon Ultra超过滤装置中的滤膜一旦润湿后应避免干燥。若在预清洗后没有立即使用该装置，则让液体保留在滤膜上，直到使用该装置为止。
- 浓缩液中的样本回收量低可能由于**吸附损失**、**过度浓缩**、或者**样本穿过滤膜**造成。
- 吸附损失取决于溶质浓度、其疏水性、温度、与过滤装置表面的接触时间、样本成分及pH值。为最大限度地降低损失，离心后请**立即取走浓缩后样本**。
- 如果样本起始浓度高，请关注离心过程，以免使样本过度浓缩。过度浓缩可导致样品沉淀和损失。