

可溶性His标签重组蛋白纯化SOP

1. 仪器设备

名称	品牌	型号
落地式冷冻离心机	力新仪器（上海）有限公司	Neofuge 1600R
结合摇床	美国SCIOLOGEX旋转混匀仪	MX-RL-E
pH计	梅特勒-托利多国际有限公司	FiveEasy Plus
电子天平	上海浦春计量仪器有限公司	JY202

2. 试剂

名称	供应商	货号
NaCl	国药	10019318
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	国药	10020318
KH ₂ PO ₄	国药	10017618
KCl	国药	10016318
盐酸	国药	10016318
咪唑	国药	F108BA0005
无水乙醇	国药	10009218
甘油	国药	10010618
Ni-TED填料	Roche	05893801001
Co-Talon填料	Thermo	25229

3. 实验准备

- （1）配制纯化所需的缓冲液：PBS pH 7.5，不同浓度梯度的咪唑溶液；
- （2）配制填料保存试剂：20%乙醇。

4. 实验流程

（1）纯化样品预处理请按照《大体积培养基样品预处理标准操作规程》，《小体积培养基样品预处理标准操作规程》或《细胞裂解及裂解液澄清》完成，取80 ul小样（IN）以备SDS-PAGE检测用；

（2）纯化填料用量按照载量10 mg/ml计算；

（3）将纯化填料加入重力柱中，待保存液20%乙醇滴完，加入10倍柱体积超纯水，将乙醇冲洗干净，最后加入10倍柱体积PBS pH 7.5平衡重力柱；

（4）用堵头堵住重力柱的下端，并用待纯化样品将填料悬匀后，与样品混合，放入结合摇床，并将结合摇床置于4℃冰箱中，结合时间不得小于30 min；

（5）将结合好的样品从结合摇床取下，于4℃冰箱静置5-10min，再用移液器将样品与填料的混合物加入到空柱中，并收集流穿样品（FT），取40 ul小样（FT）以备SDS-PAGE

检；

（6）使用10倍柱体积的PBS pH 7.5冲洗柱子，以将那些非特异性结合的宿主蛋白洗脱掉，收集样品（W1），取40 ul小样（W1）以备SDS-PAGE检测用；

（7）不同浓度梯度的咪唑溶液梯度淋洗；

（8）再用PBS pH 7.5+高浓度咪唑每一个柱体积洗一管，总共洗9管，每管取40ul小样，并记为E1-E9，以备SDS-PAGE检测用；

（9）根据SDS-PAGE结果收集目标蛋白；

5.实验清场

（1）将待重生的填料装入一个空柱中，并计算好柱体积；

（2）用重生缓冲液清洗填料；

（3）最后使用20倍柱体积20%乙醇，冲洗填料，并重悬，装入一个容器中，并将重生次数做好标记，留待下次使用；

（4）实验台面收拾整洁。

6.注意事项

（1）纯化用的试剂和纯化样品都应当置于冰上；

（2）低内毒素纯化样品必须在超净工作台处理。

The end



• 一站式蛋白抗体发现服务

重组蛋白 · 抗体 · 噬菌体文库 · 诊断原料

武汉国家生物产业基地 · 光谷抗体发现与筛选公共服务平台