可溶性MBP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SCILOGEX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
盐酸	国药	10016318
Tris	国药	30188360
EDTA	国药	10009717
无水乙醇	国药	10009218
甘油	国药	10010618
MBP填料（Amylose 树脂）	NEB	E8021V

3.实验准备

（1）配制纯化所需的缓冲液：20 mM Tris-HCl pH 7.4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA，20 mM Tris-HCl pH 7.4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Maltose；

（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5 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20 mM Tris-HCl pH 7.4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA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60 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检测用；

（6）使用30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）再用20 mM Tris-HCl pH 7.4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Maltose每一个柱体积洗一管，总共洗11管，每管取40ul小样，并记为E1-E11，以备SDS-PAGE检测用；

（8）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）使用20倍柱体积20 mM Tris-HCl pH 7.4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Maltose，冲洗填料，冲洗过程中缓慢加入，防止填料溅起；

（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

AtaGenix
• 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