

可溶性Strep标签重组蛋白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
Tris	国药	30188360
EDTA	国药	10009717
无水乙醇	国药	10009218
甘油	国药	10010618
D-Biotin	阿拉丁	B105434
Strep填料	Iba	2-4010-025

3. 实验准备

(1) 配制纯化所需的缓冲液：100 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM D-Biotin;

(2) 配制10 mM NaOH;

(3) 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100 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1mM 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°C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°C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2倍柱体积的100 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1mM EDTA冲洗柱子，以将那些非特异性结合的宿主蛋白洗脱掉，分管收集样品（W1-W5），取40 ul小样（W1-W5）以备SDS-PAGE检测用；

(7) 再用100 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 50 mM D-Biotin每一个柱体积洗一管，总共洗7管，每管取40ul小样，并记为E1-E7，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10 mM NaOH，冲洗填料，冲洗过程中缓慢加入，防止填料溅起；

(3) 用超纯水将重力柱冲洗至中性；

(4) 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；

(5) 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