

融合蛋白纯化的程序

操作程序

1 实验试剂及仪器

试剂 :NI-IDA 琼脂糖凝、GST 琼脂糖凝胶、层析柱、氯化钠、咪唑、 Triton X-100、1*PBS 、 Tris-Hcl(PH 8.0) 、 EDTA(PH 8.0)、 DTT、 谷胱甘肽 (还原型)、 20%乙醇、 3*SDS 上样缓冲液、 12%分离胶、 5%浓缩胶、 10%过硫酸铵、 TEMED、 1*SDS-PAGE 电泳缓冲液、 乙醇、 乙酸、 考马斯亮蓝 (R250)

仪器 : 恒流泵、电泳槽、电泳仪、脱色摇床、凝胶成像系统

2 操作流程 :

2.1 His-tag 纯化

试剂准备 : buffer 0 (咪唑 0mM)、 buffer 1(咪唑 20mM)、 buffer 2(咪唑 100mM)、 buffer 3(咪唑 200mM)、 buffer 4(咪唑 300mM)、 buffer 5(咪唑 500mM)

取 2ml NI-IDA 琼脂糖于层析柱中，连接恒流泵，自然沉淀后加入 20ml DDH₂O 除去保护液

- 1) 平衡 加入 30ml buffer 0 平衡内环境
- 2) 上样 样品中加入 2.1g 氯化钠和 500 微升 Triton X-100 定容到 100ml 流速 1.3-1.6
- 3) 洗脱 依次加入 buffer1-5，流速 0.5-0.7。每个 buffer 收集 12ml
- 4) 样品处理 将收集的样品和流穿液的依次通过 SDS-PAGE 电泳，确定蛋白在哪个咪唑浓度下被洗脱
- 5) 再生 用 EDTA 螯合金属镍离子，然后共价耦联结合 Ni²⁺，保存在 20%乙醇溶液中

2.2 GST-Tag 纯化

试剂准备:Buffer A(50mM TRIS-HCL PH8.0 5mM DTT)

Buffer B(100mM TRIS-HCL PH8.0 20mM 谷胱甘肽)

装柱：取 2ml GST 琼脂糖于层析柱中，连接恒流泵，自然沉淀后加入 20ml DDH₂O 除去保护液

- 1) 平衡 加入 40ml buffer A 平衡内环境
- 2) 上样 样品中加入 1/25 体积的 TRIS-HCL PH8.0 流速 1.3-1.6，过柱
- 3) 两遍
- 4) WASH 加入 30ml buffer A 洗脱非特异性蛋白及吸附杂质
- 5) 洗脱 加入 BUFFER B 流速 0.5-0.7,收集 8 管，每管 2ml 共 16ml。
- 6) 再生 加入过量 BUFFER B 洗脱后，依次加入 8M 尿素再生，纯净水，最后保存在 20%乙醇溶液中
- 7) 将收集的 1-8 管及流穿液分别 SDS-PAGE 电泳，染色脱色后，确定纯化是否完全，以及蛋白洗脱纯度
- 8) 选取纯度较高，浓度较大的几管进行透析，SDS-PAGE 电泳确定蛋白浓度

注意事项：1.纯化过程中琼脂糖保持在液体环境中，切忌抽干

2.上样及洗脱流速不可过快