

抗体纯化以及蛋白浓度测定程序

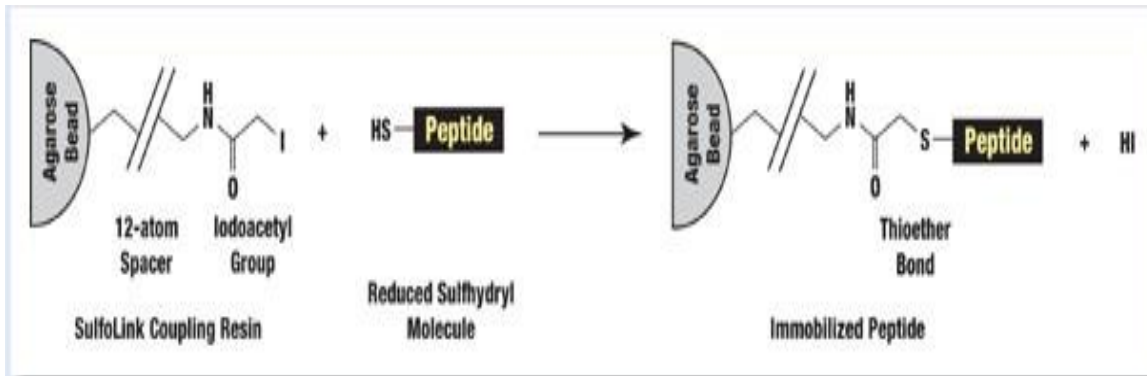
操作程序

实验试剂及仪器

试剂 : Sulfolink coupling gel (THERMO)、层析柱、氯化钠、1*PBS 、1M Tris、100mM 甘氨酸 (pH2.2)、EDTA(pH 8.5)、甘油

仪器 : 恒流泵、旋转培养器

流程 : (一) 亲和层析柱的制备



原理：活化的琼脂糖凝胶通过偶联抗原蛋白的巯基，从而使抗原结合在固相载体上

试剂：偶联 Buffer (50mM tris、5Mm EDTA-NA)PH 8.5

Wash buffer(1*PBS 320mM 氯化钠)

1) 称取 8-10mg 多肽，用 2ml 偶联 Buffer 溶解，蛋白则根据蛋白

浓度取合适体积，总含量在 10mg 左右。

2) 取 2ml Sulfolink coupling gel 于层析柱中，将抗原加入层析柱于旋转培养器上旋转 2-3 小时

(二) 抗血清纯化

1) 将层析柱静置在层析架上 30 分钟，连接恒流泵。

- 2) 平衡 40ml 1*PBS 流速 2.0、30ml 1*Gly、30ml 1*PBS 将柱子内环境平衡到中性
- 3) 上样 样品中加入 1/20 4M 氯化钠，流速 1.3-1.6，过柱两遍
- 4) WASH 加入 40ml Wash buffer
- 5) 收样 加入 1*Gly 流速 0.5-0.7,收集 8 管，每管 2ml 共 16ml。
- 6) 收集完之后，加入过量的酸将抗体洗脱干净，再用 1*PBS 平衡到中性
- 7) 将收集的抗体放入透析袋中，混匀之后取 30 微升左右用于抗体浓度测定，其余放入 1*PBS 50%甘油中透析浓缩过夜
- 8) 将透析浓缩好的抗体放入灭菌的 5 毫升冻存管中，贴上标签-20 摄氏度保存

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

3.对于纯化磷酸化修饰或者其他修饰的抗体时，则需要

先过其对照柱两遍，其中收集一遍，在纯化磷酸化抗体

项目：LOWRY 法测蛋白

原理：在碱性条件下，蛋白质中的肽键与铜结合生成复合物。Folin—酚试剂中的磷钼酸盐—磷钨酸盐被蛋白质中的酪氨酸和苯丙氨酸残基还原，产生深蓝色（钼兰和钨兰的混合物），在一定的条件下，蓝色深度与蛋白的量成正比，可根据 750nm 的光吸收值大小计算蛋白质的含量

试剂：Folin—酚试剂、4%碳酸钠溶液、0.2mol/L 氢氧化钠溶液、0.04mol/L 硫酸铜溶液、2%酒石酸钾钠溶液、1mg/ml BSA、1*PBS

碱性铜溶液：按比例取试剂配置而成

仪器：恒温箱、分光光度计

流程

1. 根据蛋白质浓度，分别精确量取不同体积的标准蛋白质溶液，各加 PBS 补至 0.2ml，使标准蛋白的溶度分别为 0，12.5，25，50，100，200 U_g/ml
2. 精确量取样品加 PBS 补至 0.2ml
3. 将标准曲线和样品各加 1ml 碱性铜和 0.1ml 酚试剂混匀，在 750nm 处测 OD
4. 以标准蛋白的浓度为 Y 轴，光吸收值为 X 轴，得一标准曲线。由样品的光吸收值计算其浓度