

可溶性GST标签重组蛋白纯化SOP

1. 仪器设备

名称	厂商	货号
超声波多通道粉碎机	宁波新芝生物科技股份有限公司	10190376
冷冻离心机	Heal Force	Neofuge 15R
旋转混匀仪	SCILOGEX	MX-RL-E
电子天平	上海浦春计量仪器有限公司	JY202

2. 试剂

名称	厂商	货号
KCl	国药	10016318
Na ₂ HPO ₄	国药	10020318
KH ₂ PO ₄	国药	10017618
KCl	国药	10016318
盐酸	国药	10011018
Tris	国药	30188360
无水乙醇	国药	10009218
甘油	国药	10010618
L-Glutathione reduced	阿拉丁	H121370
gst亲和层析填料（Glutathione Sepharose 4B）	美国GE	17-0756-05

试剂配制

- （1）配制纯化所需的缓冲液：PBS pH 7.5，50 mM Tris-HCl pH 8.0，15 mM Glutathione；
- （2）配制填料保存试剂：20%乙醇。

3. 实验步骤

（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 μl小样（IN）以备SDS-PAGE检测用；

（2）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；

（3）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；

（4）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 μl小样（FT）以备SDS-PAGE检测用；

（5）使用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（W

1)，取40 ul小样（W1）以备SDS-PAGE检测用；

（6）再用50 mM Tris-HCl pH 8.0，15 mM Glutathione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；

（7）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50 mM Tris-HCl，15 mM Glutathione，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；

（3）Glutathione溶于水为酸性，所以配洗脱液一定要用NaOH调节到pH 8.0。

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