

ProteinG纯化SOP

1.主要仪器

表1 实验所用主要仪器

所用仪器	仪器型号	公司
电子天平	NBL-214E	AEADAM
冷冻离心机	neofuge 15R	Heal Force

2.主要试剂

表2 主要试剂及其生产公司

试剂名称	货号	生产公司
Protein G	SA032005	天地人和
甘氨酸	62011516	国药
Tris	30188206	国药

3.实验内容

- (1) 待纯化样品5000g，离心5 min，收集上清。
- (2) 将上清液加到protein G柱子里，流穿收集到15 ml 离心管里。
- (3) 上样结束后，用10倍柱体积PBS洗涤柱子。
- (4) 在洗涤柱子的同时，准备 1.5 ml的灭菌EP管，预先在每个收集管里加入 50 ul 1 M pH 9.0 Tris-HCl。
- (5) 用0.1M甘氨酸溶液（pH 2.5）1 ml进行洗脱，用1.5 ml EP管收集洗脱液。收集结束立刻上下颠倒EP管进行混匀，用pH试纸测试洗脱液是否为中性。
- (6) 洗脱完毕后，再次往protein G柱里加入3倍柱体积的0.1M甘氨酸溶液（pH 2.5）彻底洗脱柱子，再用二级水5倍柱体积清洗柱子，接着用20%乙醇2倍柱体积清洗柱子，流尽后，柱子底端盖紧帽子，加入2倍柱体积20%乙醇4℃保存柱子。
- (7) 将洗脱下来的抗体室温离心12000 rpm 2-3 min，弃沉淀，取上清测OD值，计算抗体浓度。公式：抗体浓度（mg/ml）=OD280/1.4×稀释倍数），如无法显示代表浓度过高，用排枪吸出200ul打回原管中，再吸取20ul原抗体溶液，后加180ul 1*PBS稀释10倍，混匀，进行检测。
- (8) 根据测得的OD280算出的抗体浓度，取2ug抗体跑胶。
- (9) 取抗体样品送检Elisa。