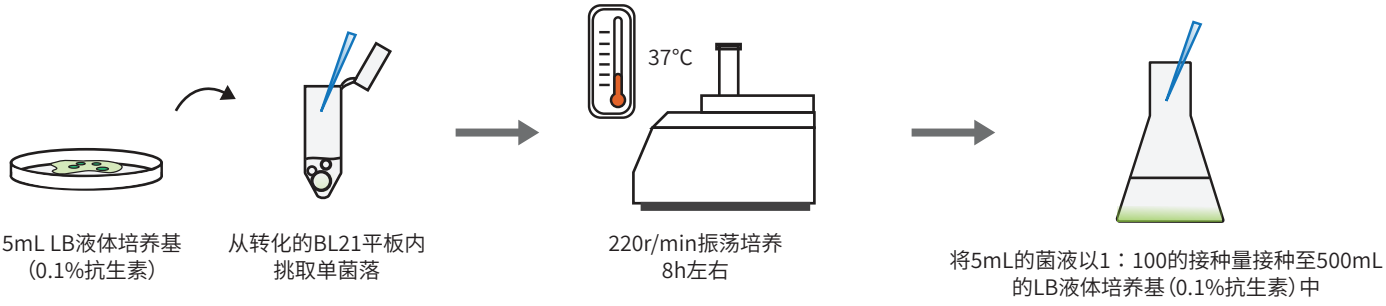
蛋白质表达、纯化

实验步骤

百灵威科技 J&K Scientific

1 蛋白质的表达（Thermusthermophilus HB27来源的S-腺苷蛋氨酸合成酶，tMAT）及样品处理



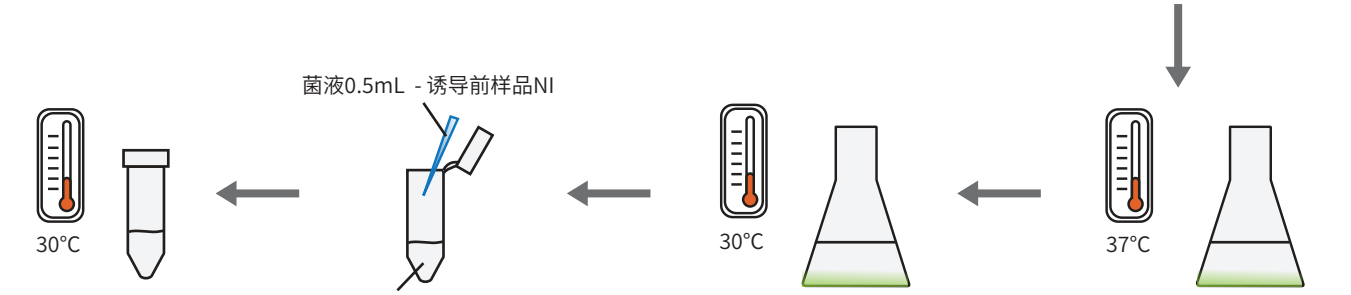
5mL LB液体培养基
（0.1%抗生素）

从转化的BL21平板内
挑取单菌落

37°C

220r/min振荡培养
8h左右

将5mL的菌液以1：100的接种量接种至500mL
的LB液体培养基（0.1%抗生素）中



37°C

培养至OD600在0.8～1.0之间

30°C

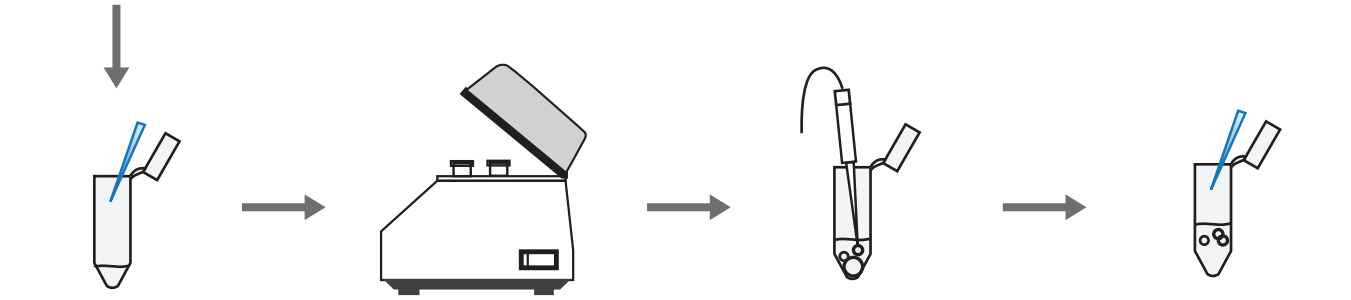
220r/min培养0.5h

菌液0.5mL - 诱导前样品NI

终浓度0.5mmol/L的IPTG

30°C

220r/min诱导6h
则表达S-腺苷蛋氨酸合成酶

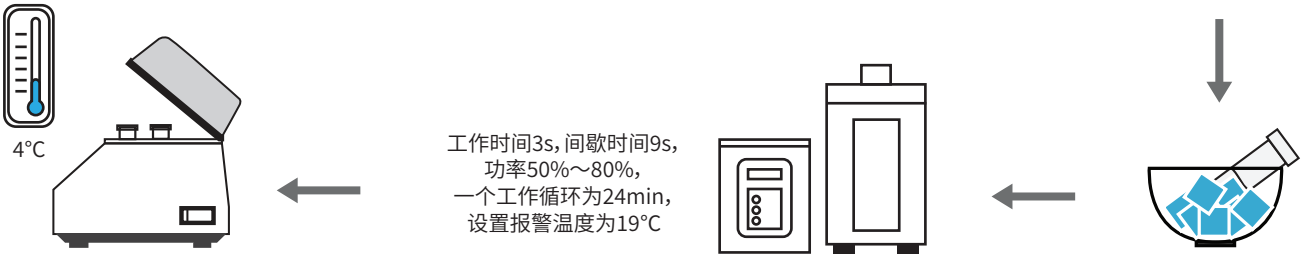


菌液0.5mL - 诱导前样品I

剩余菌液
4000r/min离心20min

收集菌体，弃上清液

用裂解缓冲液（50mL）将离心
下来的菌体重新悬浮



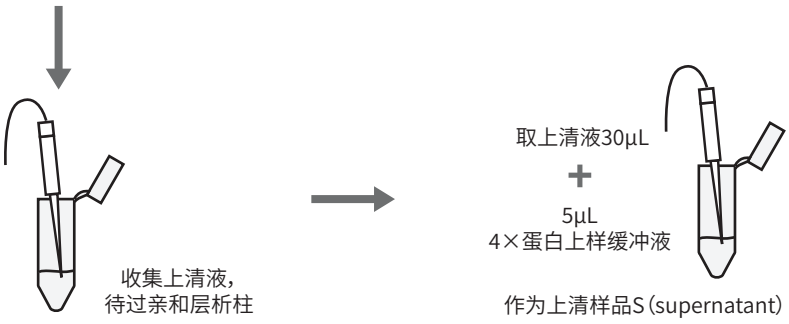
置于冰上

超声波破碎
菌液变清亮后，停止超声

工作时间3s，间歇时间9s，
功率50%～80%，
一个工作循环为24min，
设置报警温度为19°C

4°C

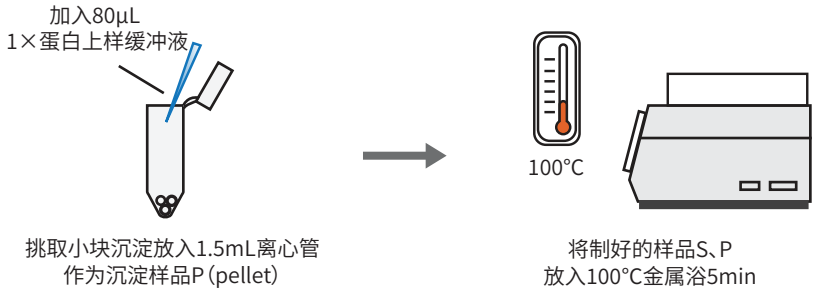
分装于高速离心管
13000r/min离心1h
（若10mL以下则离心20min即可）



收集上清液，
待过亲和层析柱

取上清液30μL
+
5μL
4×蛋白上样缓冲液

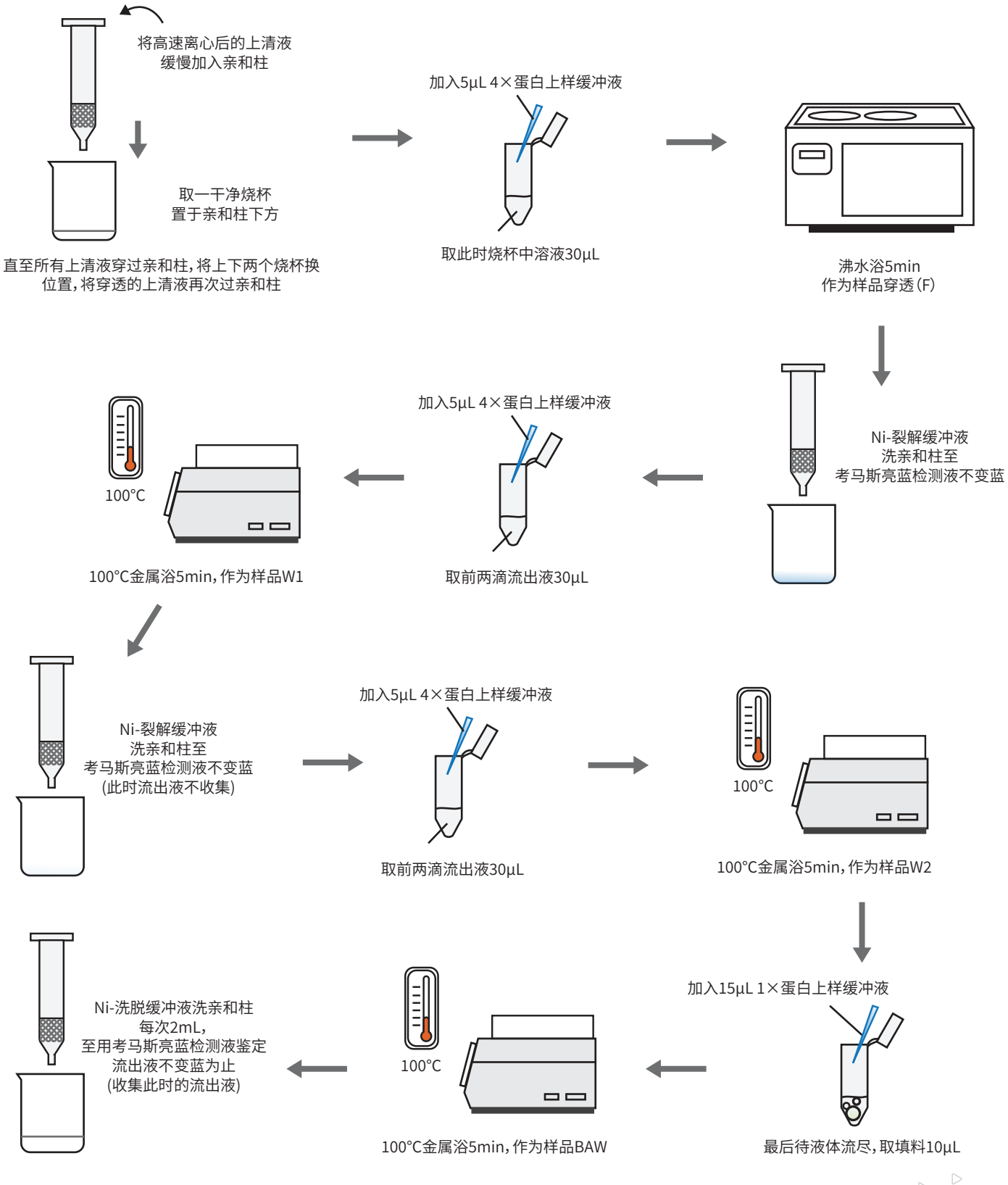
作为上清样品S（supernatant）



挑取小块沉淀放入1.5mL离心管
作为沉淀样品P（pellet）

将制好的样品S、P
放入100°C金属浴5min

2 蛋白分离纯化



直至所有上清液穿过亲和柱，将上下两个烧杯换位置，将穿透的上清液再次过亲和柱

取此时烧杯中溶液30μL

沸水浴5min
作为样品穿透（F）

取前两滴流出液30μL

100°C金属浴5min，作为样品W1

取前两滴流出液30μL

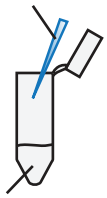
100°C金属浴5min，作为样品W2

加入15μL 1×蛋白上样缓冲液

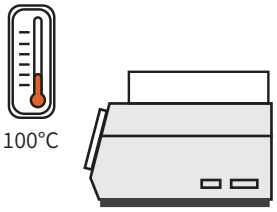
最后待液体流尽，取填料10μL

100°C金属浴5min，作为样品BAW

5μL 4×蛋白上样缓冲液

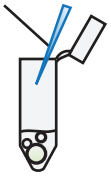


取前两滴流出液30μL

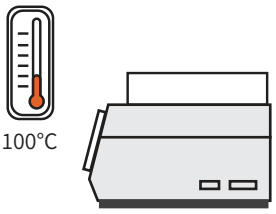


100℃金属浴5min，作为样品洗脱（E）

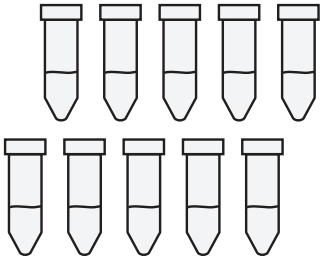
加入15μL 1×蛋白上样缓冲液



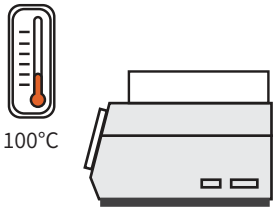
最后待液体流尽，取填料15μL



100℃金属浴5min，作为样品BAE

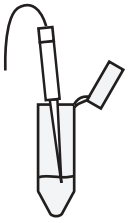


纯化过程中取样
NI、I、S、P、F、W1、W2、BAW、E、BAE

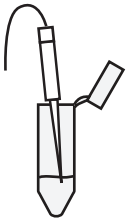


这些样品在取完后，
需要尽快在100℃金属浴中煮5min
煮样结束，蛋白已经变性，
可以将样品放在室温下保存，
以备跑蛋白电泳

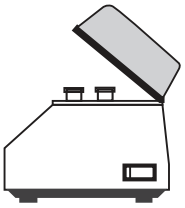
蛋白胶的上样顺序应该按照取样顺序进行，上样顺序为NI、I、S、P、F、W1、W2、BAW、E、BAE



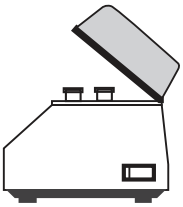
NI、I、S、P、F上样时取3μL



其余样品上样取10μL



NI、I、P等样品在上样前
需要13000r/min离心8min，
上样只取上清，避免取到管底沉淀
以保证上样量和上样浓度一致



其余样品在上样前
也应12000r/min离心1min，
保证煮样时管内部的水蒸气凝结的水珠也
全部离心到管底，
以保证上样量和上样浓度一致