

## 生物大分子纯化经验问答之三

韦新桂 (Chromatography) 北京韦氏博慧色谱科技有限公司, [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn), [weixingui@263.net](mailto:weixingui@263.net), 感谢丁香园各位战友支持  
原链接: <http://www.dxy.cn/bbs/topic/1042756>

推荐纯化相关的书籍:《蛋白纯化与实验鉴定指南》、《生物工程下游技术》、《酶工程》、《酶制剂工业》《生化实验方法和技术》,《蛋白纯化实验指南》,《生化制药学》,《药物蛋白质分离纯化技术》,《蛋白质纯化技术及应用》,《protein purification》等

请教 chromatography 兄: 刚买的 sepharose6B 150mL,这应该是膨胀后的吧? 我做实验时就不用膨胀这一步了是吗? 还有应该怎样保存呢? 看文献说是加入 0.02% 的叠氮化钠, 刚买的用过一次, 剩余的用不用这样保存呢?

对, 是已经膨胀后的, 通常这个填料保存 20% 乙醇即可。仔细看说明书, 没有可以问厂家要, 或者参考一些类似的填料即可

chromatography 老师, 又有问题请教了。我的葡聚糖凝胶柱用乙醇封柱, 再次使用后发现凝胶柱短了 5mm 左右, 不只影不影响处理结果, 会不会每封一次柱, 都会有所下降。如果想到希望的柱高度, 是不是必须重新灌柱?

这个填料就是容易收缩, 不过要只有一点没关系的。收缩多少看你用的什么型号而定, 流速别快, 我想从你说的情况看应该没事, 继续用吧, 有条件还刚性好的琼葡糖凝胶或 superdex 的就不会这么麻烦了。

谢谢 chromatography :原来乙酸铵容易挥发,样品已经冷冻干燥过了,用不着除盐了吧,可是冷冻干燥后样品不容易溶解.我还有一个问题请教,我们实验室没有电导仪,没有 PH 计, 没有蠕动泵,我做离子交换只有 2 根 2.6/20cm 的柱子, 没有这些仪器能行吗, 可以到别的实验室去做, 我是想自己能做的话可以经常摸索条件, 不用麻烦别人

样品不容易溶解也许还有别的原因,具体情况不很清楚,你可以改变 pH 看看,没设备不大好做,你只能选择阶段洗脱,靠重力流也可以.没电导是麻烦,但是也可以不用,至于 pH 那你只好用精密 pH 试纸看看了

chromatography 您好。现在我要纯化表达出来的融合蛋白,希望能够得到您的指导。1.表达的目的蛋白本身的理论 PI=5.76;因为是融合蛋白,加了 GFPuv,Flag,His6 这些 tag。所以实际等电点是不是和表达的目的蛋白理论等电点不同呢? 我把整个融合蛋白的氨基酸序列输入到 ExPASy 中, 得到的融合蛋白理论 PI=5.71。2.因为是在昆虫中表达, 蛋白存在于体液中, 里面包含了大量的杂蛋白, 所以我打算先用硫氨沉淀, 然后再选择阴离子交换, 最后利用 falg 进行纯化。(周围的很多人说.HIS 纯化不好?) 不知道这样的思路妥当不妥当? 3.关于缓

冲液的选择, 硫氨沉淀的缓冲选择, 用 tris 还是磷酸 buffer 好呢? 这是不是要考虑到下一步的阴离子交换? 硫氨沉淀如果选择 tris, PH 多少合适呢?

如果带 his 标签,最好用镍柱去纯化,其实纯化的好坏和填料,样品,用法都有很大的关系,而 his 标签还是用的最多的标签,而用 falg 进行纯化比较贵.样品直接上镍柱我觉得更好,常规的方法更费时间,不推荐

请问楼主 ACA 填料是由何成分组成的,可以自己做吗?

全名叫 Ultrogel® AcA 系列填料,是琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺混合的凝胶,自己难做.用别的凝胶过滤代替也可以如琼葡糖凝胶或 superdex

有一个问题想请教,也困扰很长时间了, 就是我在做一个重组蛋白的纯化,是生产规模的,先后经过了 Phenyl 疏水层析, Q sepharose FF 离子交换, superdex 75 prep grade 凝胶层析, Phenly 柱和 Q sepharose 柱都是梯度洗脱但是最后一一直有三条杂带去不掉, 现在知道的是我的目的蛋白和三条杂带在疏水性方面非常接近,跑了等电聚焦电泳可以看到目的蛋白的等电点是 5.2, 杂带等电点分布在 5.2 到 5.8 之间, 分子量方面目的蛋白是 47KD, 杂带分布在 30KD 到 36KD 之间, 分子筛也没有分开.想请教 chromatography 兄有没有什么好的建议? 我想把 Q sepharose FF 换成 DEAE 的, 希望可以有所改善, 如何?

换填料也未必能改善,除非全选择 HP 级别的填料也许会好点,我觉得还是把前面两步改用阶段洗脱,精细点也许会效果更好

请问填料对缓冲液是不是有一定的选择性,也就是说,是不是某种填料用某种缓冲液洗脱效果很好,换了别的就不大好了? 我用 CM Sepharose FF 纯化一种有血清培养的蛋白,做 test 时用 PBS 洗脱, 只得到一个峰, 而且含量很低, 我的柱子是够大的呀, 怎么没挂上? 请指教, 谢谢!

缓冲液选择性是有限的,没太多报导说缓冲液本身影响很大,倒是浓度和 pH 影响更大,此外要留意你样品的盐浓度和 pH 值,还有如果样品中别的相同电荷的杂质过多也会导致挂不上.要不你就换阴柱试试,或者选择更强的 SP 的试试

chromatography 兄: 你好! 再请教一个问题: Bio-Rad 公司用于凝胶层析的凝胶颗粒有一项参数如下: typical Hydrated Bed Volume,ml/g of Dry Gel 数值是 12, 是否代表每 1 克该凝胶颗粒经融胀后的体积相当于 12 立方厘米? 不知理解是否正确?

应该是吧,不过 Bio-Rad 的 bio-gel P 系列颗粒细,刚性差,流速慢,现在应该用的很少,不知道你说的是哪类填料

请教色谱兄, 如何制备 g 级单链 DNA, 如 polyT, 在线等! 关键是怎么制备出来啊?

关键看你的杂质是什么,什么来源的,常规的估计得用离子交换,如果要把双链和单链分离,羟基磷灰石是比较经典的方法,也可以选择新的球型羟基磷灰石.通过色谱柱纯化出来的:) 你最好还是去查文献, 记得<生化实验方法和技术>中就有关于单链 DNA 的分离. 你查查吧

请教一个问题，我要纯化一种大肠杆菌表达的重组蛋白，等电点为 6.2。破菌离心后发现核酸含量比较高，280 与 260 的比值在 0.5-0.6 之间，我想选用 Q sepharose FF 离子交换，缓冲液用 tris,不知道核酸对吸附和洗脱的影响怎样，或者选用别的分离方法？

如果用阴离子柱，肯定会吸附很多核酸而目标蛋白难吸附，如果可以你试试阳柱，这样也许会好点，但是前提是你蛋白在酸性条件下稳定

紧急求救：我要把一个单克隆抗体连在一个大分子量的氮杂羧酸（M=400 左右）上，怎么纯化？用 sephdex75 可以吗？我的东西量很少，大约只有 1~2mg 左右，能分离开吗？我很怕东西丢啊！

最简单的方法是透析，除盐柱也可以，用 G25 或别的公司的除盐柱子都可以。超滤离心管也行，但是蛋白太少怕吸附，回收困难

我是新手，很高兴加入你的论坛！我想问一下，你知道 Dye-Matrix Green affinity chromatography 这种柱材料吗？我也准备纯化酶，希望得到您的指导！谢谢！

其实就是染料亲和填料，不知道你要纯化的是什么酶呢，你多看看文献也许还有别的染料亲和可以，绿色的用的少，而红色和兰色琼脂糖凝胶比较常见

请问楼主有没有用过聚乙烯阳离子交换树脂？它的预处理方法怎样？使用中的注意事项也请赐教。谢谢！

没怎么用过树脂，一般都是酸碱处理，然后平衡上样，看看一些实验的书或者文献会有。或发到中药版问问，好多做天然产物的应该用过，包括做抗生素的

你们有做过谷氨酰转肽酶的吗？我的酶活老是测不好，怎么修正啊！请您赐教！

没做过，只能查文献等相关材料

请问怎样处理树脂才能损失最小？我的疏水树脂处理是这样的，在小烧杯中用碱处理半小时，然后水洗至中性，然后装柱，但是这样处理发现我的树脂，损耗特别的大，每次上面都漂浮一层树脂颗粒，再换液中被到掉了，还有什么好的办法可以减少树脂的损失吗？我这样在烧杯中处理方法可取吗？有问题吗？

如果你是生物大分子分离纯化的填料，大多不需要特别处理，直接装柱平衡使用即可，很少这样处理的，你说的情况是因为填料本身不浸润导致上浮，可以加一两滴吐温也许能改善。没见过疏水树脂是怎么样的。最好问厂家如何处理

我是想问，正常的填料比如 DEAE,CM,疏水上样使用后，每次如何清洗会损失最少，具体的清洗方法我知道的，我们实验室每次都是在小烧杯里酸碱酸或碱酸碱这样处理的，可是损失太大，在柱上酸碱处理有时会产热使柱子开裂，你有什么好办法吗？你们一般如何处理呢？

对于琼脂糖凝胶系列填料差不多都可以在位清洗，但是对于 sephadex 系列的填料因为柱床收缩难在位清洗，所以需要在烧杯中进行，前者直接在柱子上清洗即可，没什么办法，所以最好选择琼脂糖凝胶系列的填料。碱处理的时候首先需要冷却，刚配完的过柱子当然不大好，此外浓度也别太高，0.5M 应该足够了。此外可以按我前面说的加点表面活性剂可以避免填料漂浮和挂壁，减少损失。我也很少用 sephadex 系列填料，所以没这些体会。

chromatography 老师：我在做纯化 IgG 的实验，现在做到过 DEAE-52 这一步了，我买了 10g 武汉生命技术有限公司分装的 Whatman 公司的 DEAE-52，批号为 060308 用蒸馏水浸泡了 4 个小时，还未进行酸碱处理，但是体积只有 20ml 的样子，而文献上介绍的每克 DEAE-52 可以溶胀到 6-8ml 的柱床体积，不知道是什么原因？请 chromatography 老师解答，在线等待！

纤维素填料有两种，一种是预溶胀的，这样的填料 1g=2ml 是正常的，一种是干粉的，这样的填料也许能达到 6ml 左右，用这方法纯化抗体有点古老，最好是选择亲和的方法，快且好。

chromatography 老师：预溶胀的和干粉的纤维素填料在外观上有什么区别吗？我打电话问试剂公司的人，他们也不知道卖的是预溶胀的还是干粉的

预溶胀的也是干粉的。

问一个菜菜的问题：我将发酵液离心 乙醇沉淀后，复溶的沉淀活性还好 但是蛋白含量损失严重，总蛋白量很少。因为活性还好，希望我的目标蛋白还好吧！下一步我想跑阴离子柱，但是我的蛋白含量很低，会有影响吗？跑柱子对蛋白含量有什么要求？

如果你的目标蛋白含量不高，用沉淀的方法肯定收率会不高，我觉得还是直接上柱子好点，样品浓度低也没关系，都可以，只是上的蛋白总量不能太少，否则难检测。离子交换，亲和，疏水柱本身有富集的作用，所以浓度低没关系

我最近在用 sephacryl 200 装柱但是装上开始看不出来有裂纹。但当我用平衡液平衡后就出来了裂纹。而且是靠近柱子的进水口的位置。我都是过夜平衡的。我用的平衡液是 50 mM trisHCL 5mMEDTA 0.15M NaCL，装柱用的是蒸馏水。后听说用 0.15M NaCL 装柱好我改用 NaCL。但是还是不行。装柱子的流速是 5 ml/min 流一会后改成 2.6ml/min，是不是我流速太大？？但是我没有超过 sephacryl 200 的压力限制。请问您是否用过这种填料。用过的话能告诉我您装柱子的详细过程。参数和注意事项吗？

已经回复过，还是你的流速过快，这个填料刚性还是不如琼脂糖凝胶，所以压力大自然会导致收缩，建议别超过最大线流速，在使用时用到最大线流速的 50-70% 就很保险

你好！我想纯化一个蛋白，想用离子交换和凝胶的方法，由于没有经验，能不能发一些柱子选择的材料

材料已发，离子交换最好选择琼脂糖凝胶系列的填料，而凝胶过滤也最好选择琼脂糖和葡聚糖凝胶混合制备的填料，这样刚性好，不容易变形，清洗也方便，而且可以选择高分辨率的 34 微米的填料，分离效果更好

请问有没有关于各种填料的组成、结构和性质等的相关资料，有的请给我发一份

遗憾没特别全的,你可以看<生物工程下游技术>里面很详细,相信对你有帮助.也可以参考各家的产品目录及说明书,专业点的公司都写的很清楚

我的样品现在检测纯度已经是单一的物质了，但是样品经旋转蒸发后依然含有 TFA,不知这样可以做质谱吗？我应该怎样出去 TFA,谢谢！

可以反复溶解干燥,这样就会好了,你可以问做质谱会不会干扰就知道,如果不影响那不就简单了,发到外面问问吧,其实应该影响不大,因为液质联用的时候溶剂中也该有 TFA 的

我是做蛋白纯化的,现发现原核表达的 GST 融合蛋白不能与 GST Binding Resin 结合,或结合很低,且有杂蛋白,我试着在蛋白样品中增加 DTT 的浓度和降低样品过柱子的流速,可还是纯化不出来,请问能不能用 0.3%SKL 变性溶解后直接上柱子纯化?这是第一个问题。其次,我用 SKL 溶解包涵体后用 PEG20000 浓缩,用蛋白核酸测定仪得其浓度有 600 多微克每毫升,可跑电泳后未发现任何蛋白带,怀疑是蛋白降解了,为什么?浓缩时是在 4 度进行的

我没在变性情况下上过这样的柱子,但是你可以试试,我觉得你最好是留意你破碎的操作,因为一旦 GST 部分没活性,吸附不会好的,所以你破碎温和,时间短,控制温度,破碎后马上纯化以保证 GST 部分没活性这样也许吸附更好,此外可以把样品和填料混合一段时间再洗柱子试试.电泳不出来有可能是别的干扰,不一定是蛋白降解,重复几次或者提高浓度试试

我想做免疫亲和层析,用填料包被抗体。现在有两种填料可选择: CNBr activated Sepharose 4B, CNBr activated Sepharose 4 Fast Flow, 我把说明书大概地看了一下,好像各有优势: 4B 结合力更强,为 25-60 mg  $\alpha$ -chymotrypsinogen/ml drained medium, 而 4FF 为 13-26 mg  $\alpha$ -chymotrypsinogen/ml, 差不多相差整整一倍,另一方面 4FF 的刚性更好,因此流速可以很快,最大可达 150-250 cm/h, 所以适用于大批量生产,而 4B 只有 75 cm/h, 我要分离的是膜蛋白,因此含量不是很高,而且抗原抗体的结合力也未可知,不知道这种情况下我应该更注重哪方面呢? 应该选择哪种填料更好呢?(看过一些书籍和文献,大多数提到的是 4B, 是不是还是它更经典呢?)

还可选择 NHS 活化的琼脂糖凝胶 FF, 我觉得你列的两个都可以, 其实你如果连抗体, 通常多抗 10mg/ml 而单抗 5mg/ml, 所以如果要大量做, 流速更重要, 偶联的效率对你的配基都足够了。NHS 活化的琼脂糖凝胶 FF 活化偶联效率, 流速等都不错, 主要是非特异吸附小, 免疫亲和酸性条件下洗脱填料更稳定, 通常我连蛋白都用这方法。

我纯化的是外膜蛋白中的一种,表达载体是 pET32a, 宿主菌为 BL21.用 IPTG 诱导的效果很好,但是到提纯这一步,就一直与 Ni 柱结合不上去。我买了 QIAGEN 公司的 Ni-NTA Agarose (25 ml).根据提供的操作步骤做,结果就是与 Ni 结合不好,根据说明书中所列举的可能的原因进行了试验步骤的改进,但结合效果还是差强人意!!说明书上说结合的时候,Ni 与蛋白要在 4 度,结合 1 小时,后来我觉得结合的时间可能太短了,就改为结合过夜,但是结合的效果还不是很很好.另外,说明书上说裂解液中的咪唑浓度过高也会影响结合效果,我也降低了其中的咪唑浓度,但结合还是不好.此外,我也用了 ACTIVE MOTIF 公司的 Ni-TED Spin Columns 做过,结

合是很好,但在最后的洗脱中并没有我要的目的蛋白。真不知道还有什么其他可能的原因?对于结合步骤还有什么可以改进的方面呢?

你的蛋白分子量大吗,其实原因也很简单,主要是你选择的填料都是作用力比较弱的,你可以选择普通的镍琼脂糖凝胶试试,配基密度更高,作用力也更强,可以避免蛋白本身和填料作用力弱而挂不上的情况,当然你也可以在变性的条件下去挂柱子,这样也许会好点, [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载下也有有关镍琼脂糖凝胶和镍 NTA 琼脂糖凝胶的说明书,里面有讲它们配基机构上有什么不同,而 Ni-TED 作用力比 ni-NTA 更弱点.不知道你说结合很好是指目标蛋白结合很好还是什么,如果你指目标蛋白吸附很好,你可以增加洗脱咪唑浓度试试.此外还有一种情况是样品中有东西干扰吸附,你把样品透析再上试试,都不行,那只能换填料试试,最简单的判断是哪种填料颜色越深,配基密度越高,吸附力越强.也可以参考说明书,每毫升上镍离子的密度越高作用力也越强,应用范围相对更宽点

我的重组蛋白的分子量大约 56kD 的.Ni-NTA 我也在变性条件下做过,结果和 Native Condition 的结果没什么差别.也是结合不好

变性条件样品最好选择用盐酸胍变性更彻底,标签暴露更充分,有利于结合,没办法的话就换填料

1、请问 Sephadex G 75 superfine 和 Superdex 75 prep grade 分离效果差别大吗, 价钱是差很多。我现在用 Superdex 75 prep grade 分离效果比较好,但这种胶目前没有现货,又比较贵,不知 Sephadex G 75 superfine 能否代替? 2、请问用于 SDS-PAGE 的 MARKER 能否用于 PAGE? 3、怎么判断蛋白质含有二硫键? 数目多少? 4、怎么测柱效?

当然很大,Sephadex G 75 superfine 刚性差,即使是 superfine 颗粒也比 Superdex 75 prep grade 粗,而且不如后者均匀,流速慢,因此很难用前者代替后者,前面的是葡聚糖凝胶而后者是琼脂糖和葡聚糖混合制备的凝胶,所以后者刚性好,不容易收缩,流速也快,正因为不是同一级别的产品,所以价格不同,我们公司也只生产后面这种凝胶过滤的填料.2,这个没做过,理论上应该不能代替,3 二硫键只能做结构或者看序列才知道,柱效测定方法: 用 $<0.5\%$ (30 微米)或 $<2\%$ (90 微米填料)柱体积的 1%丙酮溶液测柱效率及峰形,柱效算法为  $\text{柱效} = L/N$ ,  $L$  为柱床高,  $N$  为理论塔板数。  $N = 5.54 \times (V_e/W_{1/2})^2$  的平方,  $V_e$  为保留体积, 而  $W_{1/2}$  为半峰宽

还有个问题,我做蛋白分离的组分浓缩,用旋转蒸发器每次样品离心都有沉淀,尽管浓度才 20mg/ml, 请问这正常吗? 这会损失蛋白啊! 我也用 30%的聚乙二醇 (mw12000) 浓缩, 但会粘到透析袋, 也浪费不少, 无所适从, 请高手指点!

蛋白浓缩最好别选择旋转蒸发的方法,会导致蛋白变性而损失,透析粘壁部分可以用缓冲液冲, 没办法, 浓缩总是有点损失的

您好! 我有个问题想向您请教, 我想用 sephadex G10 分离红细胞膜蛋白, 不知道洗脱液应该怎么选择呢?

这柱子除盐还可以,要分离蛋白估计是不可能的,好好查文献看看,洗脱和平衡用的是一样的缓冲液,如 PBS 即可

我最近灌了根 DEAE Sepharose FF 的柱子，装得比较大，后来洗脱的时候很麻烦，更糟糕的是柱子再生时一直洗不干净，1M NaCl、0.5M NaOH 都用了，还是不行，柱子显淡黄色，请问还可以用什么方法再生柱子

0.5-1M 醋酸洗几个柱体积,如果还这样那没办法,这些填料用完都不会和原来一样白的,没事

有一个关于蛋白纯化的问题请教,我的蛋白是以包涵体形式融合表达的,我选择用 Ni 柱进行亲和层析纯化,在纯化前用 6M 的盐酸胍溶解包涵体,然后用 0.22um 的过滤器过滤,会堵过滤器,用过滤后的液体进行纯化,洗脱液中 SDS-PAGE 电泳没有蛋白,我对未过滤的溶液进行离心还没有见到沉淀物质, 我应该怎么办啊,附带说明一下,我的蛋白是采用溶菌酶溶解的,室温溶解半小时后涂片显微镜下观察可以看到菌体裂解完全,后又加了 Dnase1 消化 DNA 2h

已经回复过,样品浓度别太高,此外先过 0.45 膜,这样不会堵,盐酸胍的样品不能直接跑电泳,需要先用三氯乙酸沉淀蛋白挥干溶剂,再用电泳的 loading buffer 溶解跑电泳这样盐酸胍才不干扰.实验书中有详细操作.或者你用尿素溶解,这样的样品可直接跑电泳

我也马上要做 Ni-NTA 亲和层析,问题如下: 1: 用 PBS 重悬的包涵体沉淀重新离心,然后用 8M 尿素溶解(室温过夜?)后就可以上柱子了吗?是不是在溶解前用 50 mM Tris(pH 7.0-8.5) 洗涤下? 我的蛋白 15KD 左右。溶解后是不是好要离心去除未溶解的沉淀? 增溶需要加入还原剂吗? 2: Ni-NTA 柱子需重新装 Ni 离子,柱子用乙醇保存的,我放掉乙醇后直接灌入 Ni,用 PBS 冲洗直至 A280 稳定可以吗? 冲洗后加入溶解的蛋白,然后直接用 pH 6.3 PBS 冲洗可以吗? 尿素浓度就降低了,蛋白会逐渐复性吗? 3 洗脱时直接降 PBS 的 pH 值,用 pH 值洗脱,可以洗脱的比较彻底吧? 最后一个问题,我表达的蛋白用来打抗体的,这样得到的纯化蛋白可以打抗体了吧?

1.样品当然最好要离心过滤,否则容易堵柱子,如果溶解不错可以不加还原剂,因为它会还原镍离子导致吸附蛋白能力下降。2.乙醇放完最好先用水洗柱子再灌镍离子溶液,为做更好,可以放置 1-2 小时,再洗掉未结合的镍离子,这样螯合会更好,也可以反复过镍溶液,总之延长螯合时间可以保证充分挂镍离子.水洗后,直接用平衡缓冲液平衡上样即可。3.洗脱最好还是选择用咪唑去洗脱,通常降低 pH 不一定能把蛋白洗下来,你的问题比较多,最好直接电话问公司的人,这样更清楚,好的公司都有专业的技术支持。[www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载下有镍柱的说明书及常见重组蛋白纯化都写的很详细可做参考。

我现在在做镍柱层析,用的至进口的 1ml 预装柱,目的蛋白大约 17KD,上样缓冲液是: 50mM Tris-cl, 0.5M Nacl, 5mM 咪唑, PH7.9 洗涤缓冲液是 50mM Tris-cl, 0.5M Nacl, 60mM 咪唑, PH7.9 洗脱缓冲液是: 50mM Tris-cl, 0.5M Nacl, 1M 咪唑, PH7.9。我一开始时洗脱目的蛋白时,比较好,大约 1ml 后就有一个明显的蛋白峰(我是用 280 吸光度测得)。但是从那以后就在也没有收到目的蛋白,我昨天竟然在 洗了将近 4ml 后出现一个小峰,我的目的蛋白没问题,您觉得的可能会有什么问题我没注意到,还有我想问的几个问题: 1 一般洗脱目的蛋白峰应该是什么趋势,一般在洗脱多少各柱体积会出现蛋白峰。2 我昨天滤洗脱液时发现滤纸竟然是浅蓝色,我用 500mM Tris-cl, 2.5M Nacl,溶的,加了 DDW 后,发现 PH 值高,就用浓盐酸调的 PH 值,我现在怀疑是浓盐酸把咪唑反应了,我想问问浓盐酸可以影响咪唑的性质吗? 咪唑溶液怎么配呢? 用什么调 PH 值呢?

.实验其实是经验性的,需要多做,同时也需要有信心,还有就是问周围做的比较熟悉的,或者直接问专业的公司的技术支持,这样可以少走弯路,其实洗脱应该都不一样,所以遗憾没办法告诉你具体在什么位置,你用的是机器,那你可以直接走个线性洗脱,通常应该有两个峰,一个是未被吸附的大峰,一个是小点的洗脱峰,但是开始洗脱前需要先用平衡的缓冲液洗 5 个柱子体积再开始拉线性梯度洗脱.你可以多上点样品或者换大点的柱子,有时候柱子太小不大好做,还有你需要了解到 底你的样品是吸附还是没洗下来才能知道怎么去解决.同时 10 个蛋白中有 1-2 个挂不上,这时候也许需要在变性条件下去做,此外也可以换载量更高,作用力更强的填料。2.盐酸不会影响咪唑的.不知道什么原因变兰色.你重新配看看,不知道 DDW 是什么东西

我们把双蒸水称为 DDW

我想那你缓冲液变色也许是别的原因吧.重配试试

你好,我是做提取多糖的实验,提取完了然后用凝胶过滤层析分离多糖的不同组分,我们学校还没人做过,我是一头雾水,希望能指点一下!我做的是海藻多糖,选用的是 Sephadex G100!

参考<生化实验方法和技术>中的凝胶过滤分离或者看文献,没办法在这里说详细实验

1、我用 GST 亲和层析柱 (GSTrap) 纯化的 GST 融合蛋白经过分子筛进一步纯化之后 GST 上是否还结合着还原型谷胱甘肽? 能否再被 GSTrap 柱结合? 2、我昨天用该柱纯化三个样品 (AKTA FPLC 系统), SDS-PAGE 检测发现三个样品浓度都很高 (菌体裂解液上清), 但是过柱子紫外检测只有一个样品的紫外吸收正常 (穿过柱的溶液 1900mAU) 且上柱及洗脱时紫外稳定, 其它两个样品都只有 30mAU 左右, 并且同一个样品上两次样也相差很大, 还有流速从 0.8mL 增加到 1.5ml 时紫外吸收从 0 突然升到 30mAU, 请问这是怎么回事啊?

1.这还真没做过,你可以试试透析或者过除盐柱子,然后把样品再上柱子试试。2.理论上不应该如此,至少也应该差不多才对,你多做几次试试,或者清洗系统,你不连柱直接进样试试,如果不正常说明检测器的问题,如果它正常,你连柱子走缓冲液看看,自己分别排除看看问题到底出在哪里

问一下色谱兄, Ni 洗脱液可以直接上疏水色谱柱么, 我的洗脱液成分是: 0.5 M NaCl, 0.25 M imidazole, 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4

这样的条件也不一定,反正只有做才知道,如果挂不上可以提高盐浓度, 不过保险我觉得加点盐到 1M 再上好点。

我刚开始做一些分子生物学的实验, 大家有什么基础的东西分享一下

<分子克隆>应该不错了,如果要了解分离纯化请参考以下书籍:蛋白纯化与实验鉴定指南》、《生物工程下游技术》、《酶工程》、《酶制剂工业》 《生化实验方法和技术》,《蛋白纯化实验指南》,《生化制药学》,《药物蛋白质分离纯化技术》,《蛋白质纯化技术及应用》,《protein

purification》等

请教楼主,有没有比较好的蛋白灭菌方法呀?

直接过 0.22 微米的滤膜即可。

我用 G-100, 装 16 / 40 的柱子, 装柱后过柱流速最多达到 0.3 ml / min, 而我想要用 1 ml / min 的速度过, 这是怎么会事呀, 我装了 4 次了都不能解决这个问题, 会不会是填料处理不当, 或者有其他原因, 请多多指教!

装柱子时别压太紧,越压反而流不动.此外还留意看柱子底下有没有堵,通常这样的 1ml/min 应该没问题.此外要是凝胶柱子,你的柱子有点短,不一定能达到最好的分离效果.可以加长点到 60-100cm 效果会更好

请问高手:我做的是两种绒山羊的绒毛蛋白的区别,基本思路是对提取出的蛋白质混合物进行双向电泳,然后对不同的蛋白点进行质谱鉴定,有人说在电泳之前先过柱子,可以选自己感兴趣的某一大小范围的蛋白,减少些工作量和资金投入,这种方法可行吗?我觉得双向电泳本身就可以做到这一点,请高手帮忙,主要是考虑结果好坏与资金投入问题,谢谢喽!

可以先提取直接跑电泳,如果没差别再进行分离,再跑电泳,先从最简单的方法入手吧,也可考虑 HPLC HPCE。

如果我想做分一个大约 50KD 的跨膜糖蛋白,目前的可行性有多少,希望你能推荐一些这方面的书。

查文献看什么糖蛋白,选择亲和纯化比较快,书可以参考:<蛋白纯化与实验鉴定指南>、《生物工程下游技术》、《酶工程》、《酶制剂工业》《生化实验 方法和技术》,《蛋白纯化实验指南》,《生化制药学》,《药物蛋白质分离纯化技术》,《蛋白质纯化技术及应用》,《protein purification》等

我看实验室里别人过柱子还连了个仪器,防止没有液体时产生气泡.我打算用 Ni-NTA 柱纯化我的包涵体蛋白,用的是那种挺小的柱子,一次只用 2ml 填料.以前从来没做过,怯怯地问一句,那么,我加完一次 buffer 后,是等它流完再加下一批的呢,还是不能让它停止呢?

可以不等流完加下一批.只是换不同的缓冲液或样品最好流完再加,不加压力情况下不会有气泡进柱子的,尽管放心

楼主,我是新手,正在做 RP-HPLC,用的是 analytical Vydac 的 C18 柱子.梯度洗脱时,样品峰总是分不开.不知道能否通过优化洗脱条件,使他们分开?怎样优化?

减少上样量,降低浓度,此外延长梯度或者采用三元体系,如水相中加 5-10% 甲醇,而另外一相不变看看,好久不做 HPLC,你发到外面看看

1、最近在用辛酸-硫酸氨法纯化单克隆抗体,步骤是按照《免疫学常用实验方法》作的。

但电泳结果显示，辛酸沉淀后，弃去的沉淀中有较多的目的蛋白，并没有达到去除非 IgG 类蛋白的目的；而硫酸氨沉淀后，上清中基本没有目的蛋白。因此考虑辛酸加量减少（原来是 33ul/ml），而硫酸氨沉淀增加一步，进一步去杂蛋白。不知这样会对抗体有什么影响没有？手里只有辛酸和硫酸氨，别的方法没办法试。2、我们这里还有一个蛋白，每次纯化后。体积有几百毫升，需要浓缩到几十毫升，现在用的是透析，需用大量 PEG，不知还有没有其他更快更省时间的方法？最好还要省钱。

实在没用过这些方法，沉淀样品浓度不同条件是不一样的，要想纯点最好是过柱子，[www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中有抗体纯化的方法，你可以看看。抗体纯化最好还是选择亲和的方法，快而且纯度高。2。浓缩如果体积大可以用超滤的方法，此外体积过大可以改洗脱的方法

我用分子筛过样品时，上样体积一直是 1ML，浓度是 20mg/ml。因为我看资料上说过分子筛时浓度控制在 10-20mg/ml 较好。而我又想尽可能减少上样体积。我在考虑是否可以增加到 30mg/ml，因为我的样品量实在少。我不可能去不断尝试。想请教，到底是浓度影响大，还是体积影响大？

体积影响更大点,浓度其实没很明确的限制，但是当浓度高时就要适当降低上样体积。

我想请教一个弱弱的问题，现在在做茶叶中蛋白质提取，茶叶研磨，水浸提，乙醇沉淀后得到的东西好像含有多糖等其他东西，很粘稠，难以烘干，老板要求我得到粉末状的蛋白质粉，请问有什么好的建议吗？如何除去这些杂质？谢谢了！

乙醇沉淀的样品肯定很杂,你只能看看文献植物蛋白怎么提取，可用乙醇分级沉淀或超滤等，好把糖和蛋白分开。

请问：我在做一种蛋白，精制过程中发现该蛋白被降解，SDS 电泳会一直存在两条蛋白带，大小相差 5K 左右，试过 Ni-chelating，亲和柱，疏水柱，离子柱，因为蛋白大小太接近没有试凝胶柱，均不能得到一条纯的目的带，现在采用的方法是尽量降低蛋白浓度进行精制，用那种不吸附的树脂精制，但除杂效果不好，只能采用吸附柱，但又担心吸附蛋白富集后又被降解。

先的到蛋白,考察稳定性,看什么原因可以降低降解,或者返回看看样品处理过程,重新制备样品再纯化,需要知道原因再说解决的方法

我用离子交换法提纯人 DNA 聚合酶，洗脱下的含有 0.4M 的磷酸钾，下一步层析的样品要 0.02M 的磷酸钾浓度上样，可是把蛋白用蔗糖浓缩后，再用 0.02M 磷酸钾透析过夜后，结果样品膨胀的很多，蛋白浓度非常低，很难进行检测，该怎么办？是先透析还是先浓缩啊？如果先透析后再浓缩的话，那磷酸钾浓度就不符合上样条件了，该怎么办？

如果你上的是离子柱,体积大点也没关系呀,通常都是先透析再浓缩的，最好的办法是超滤过滤除盐柱除盐交换缓冲液。

您好！我要从发酵液里提取约 36kDa 的蛋白酶，只进行了离心过滤，然后用酒精进行了分

级沉淀，接下来我应该怎么进行能比较简单有效呢？多谢指教！

这样的问题真很难回答，你可以提取完直接过柱子分离纯化，乙醇沉淀容易使蛋白失活。具体的实验还是多看实验书和文献，在这里只能就具体问题讨论，一些常识性的东西或者很泛泛的问题，很难得到很好的解决方法，此贴其实只最纯化生物大分子而言，如果不是涉及到过柱子纯化的问题，我难给满意的回答

韦兄，有没有对纯化辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶这2种东西的好建议和思路？公司ELISA和Western检测时有些样品中有本底的表达，要纯化除去这两个东西

没特别的建议，我看文献前者有用硼酸琼脂糖凝胶去纯化的，因为它是糖蛋白，但是CON a好象纯化不了，我没见过文献，后者我看的文献少，你查查看，不很清楚

现在只能得到浓度较低的蛋白纯品，蛋白只要一富集（含有杂质的前提下），比如过吸附柱，溶出后就会降解了。不知添加蛋白酶抑制剂是不是比较有效和可行的方法之一。还有，Ni-chelating的吸附能力太强了，我的蛋白在Ni柱上太聚集了，有没有办法降低它的吸附能力，已达到目的蛋白在Ni柱上保持较低浓度而不被降解呢？

那你也可以看看改变pH等或者加抑制剂，总之就是找到能抑制的方法。想降低作用力也简单把镍离子换成钴离子就可以，也可换成镍NTA琼脂糖。

我正在提出一种酶，等电点在10--11之间，打算购买阳离子柱，请问一下大侠：是强阳离子交换剂还是弱阳离子交换剂更合适？

选择强阳离子的就可以。其实都差不多，只是强的pH范围更宽。我喜欢用强的

我目前从虾中提取抗原，过了葡聚糖G100，可是只有一个峰，而且峰值持续了30ML，怎样作下一步，您有什么建议吗？还有，可以推荐基本蛋白质分析方面的书吗

不知道你多大的柱子，我觉得你看文献，其实第一步最好选择离子交换，这样处理量大点也好检测，现在你也可以再做离子交换。www.wsac.cn资料下载中也有一些材料，会对你了解纯化有所帮助。书可以参考：《蛋白纯化与实验鉴定指南》、《生物工程下游技术》、《酶工程》、《酶制剂工业》、《生化实验方法和技术》、《蛋白纯化实验指南》、《生化制药学》、《药物蛋白质分离纯化技术》、《蛋白质纯化技术及应用》、《protein purification》等

我做离子交换层析的，每次实验大概需要连续24小时。现在层析到一半的盐浓度梯度时，就因为客观原因（实验大楼晚上锁门，且不准在内留宿）不得不停下来，第二天早上怎样接着洗脱啊？假如前天洗完0.27M磷酸钾，第二天要接着洗0.30M的，怎么办？

做这么长时间是比较少见的，建议换快流速的琼脂糖凝胶的填料，这样洗脱会快，时间短，洗脱不需要流速太慢，至于你实验的事情不好说，只能你自己安排，但是样品在柱子上时间过长会变性或者活性降低

我是做纯化的新手，请教一个比较简单的问题。用凝胶纯化蛋白的时候，大分子蛋白不进胶的部分是否是一个床体积后洗脱下来还是之前就能被洗脱？

理论上应该是这样，但是如果还有别的吸附作用力那就不会这么快下来，也是可能的，但是这样的情况很少

我想再问一下，我准备提纯的酶有文献记载是 12—16k,或者 30—40k,PI 是 10—11 之间，我想购买阳离子柱，现在比较 Pharmacia 公司的 SP Sepharose FF（琼脂糖）和 SP Sephadex C—25（葡聚糖），请您帮忙分析一下用哪个更合适，非常感谢！

前者刚性好,使用方便,后者型号老，建议最好用前者。

在比较这两者的“排阻限”时，SP Sepharose FF（琼脂糖）是 400000；而 SP Sephadex C—25（葡聚糖）是 30000 和 200000。因为我要分离纯化的那个酶有可能是 12kd，因此我就不确定用哪个好了，能否再麻烦您给分析一下，谢谢！！

通常分离蛋白的离子交换填料不需要考虑排阻限，所以前者更常用。后者太少用了，型号也老，流速也慢，载量也会低。

过了柱子效果不理想。该怎么优化条件呢？第 8 和 9 泳道是洗脱的蛋白，目标蛋白 66KD，柱子为 Ni-NTA

用不同浓度的咪唑做阶段洗脱，此外注意破碎条件，具体的优化谈过好多次，查以前的帖子吧。或者看看 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中的说明书会有帮助

我又想请教一个问题，我想用 EK 酶处理我的蛋白，将 His Tag 给切掉，能不能指点一下关于切除标签后蛋白回收（精制）的策略

这个没怎么做过,其实那标签很小,我想过凝胶柱子就能分开,或者再上镍柱,把带标签和切后标签都吸附,目标蛋白穿透即可,或者干脆在柱子上切

要从蛋白粗体液中纯化一种蛋白，这种蛋白是一个未知蛋白，只是知道分子量大小是 5.5 千道尔顿。跑电泳可以跑出来，但是同时有血清白蛋白，大约 6.7 千道尔顿。我上过一个 DEAE 纤维素离子交换层析柱，增大离子强度洗脱后，只出现一个峰，但是在这个峰的前面还有一个小小的小峰（和主峰比较真的很小很小），所以只是收集了这个大的峰值的液体，收集下来之后证明只是白蛋白，我的蛋白都掉了。我想问的是：这是不是说明我的蛋白挂不到这个柱子上？还是说那个前面的小峰是我的蛋白呢？如果是，那怎么能把它分离出来呢？能不能教教我怎么提纯我的蛋白呢？还有什么好办法？我之所以用 DEAE 离子交换层析是因为国外的文献是这样做的，但是我为什么提不出来呢？是不是方法错了？

如果很小那你也收集检测看看是不是你要的,此外如果只是白蛋白和你目标蛋白,你也可以过蓝色琼脂糖凝胶去特异吸附白蛋白那就可以把它们分开,总之每个部分都收集好知道到底你的东西在哪里

我是个新手，我想问一下，做血清双向凝胶电泳前，为减少干扰，血清标本中的白蛋白、免疫球蛋白、转铁蛋白、抗胰蛋白酶和触珠蛋白这些高丰度蛋白该如何去除掉啊？谢谢！

去白蛋白可以用蓝色琼脂糖凝胶,免疫球蛋白只用重组蛋白 A 琼脂糖凝胶可以去除一部分,抗胰蛋白酶可以选择胰蛋白琼脂糖凝胶,别的也许需要专门的试剂盒或者抗体柱,此外也可以用离子交换等试试,没做过这个,看看文献都怎么做的或者发到外面问问

那么去白蛋白的蓝色琼脂糖凝胶有商品化的吗？我见 millipore 公司有一个去白蛋白的试剂盒，我问过他们说特异性去白蛋白的，不知道是不是你说的这个蓝色琼脂糖凝胶呢？它一定不会吸附我的目的蛋白吧！那个试剂盒还蛮贵的，不知能否拿来用？你有什么建议？

差不多应该都是用这样的填料,个别公司有用抗体的亲和柱那更贵,载量也少点,其实就用普通的蓝色琼脂糖凝胶即可,有商业化的.[www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料 下载中就有说明书,当然你有钱用试剂盒也可以,其实特异性还是不错的,通常不怎么吸附目标蛋白,因为白蛋白太多,这是很经典的方法

我是个新手，准备分离出小分子量的蛋白（1000-5000），并尽量多分几段，想采用葡聚糖凝胶 G-25，不知怎么样？小分子量的 Mark 又不知从哪里买？请搂住给予指点

估计效果一般,建议选择颗粒更细的填料,当然你也可以试试 ,但是柱子要长到 1 米,上样要小 1-5%柱子体积,至于小分子量的 Mark 我也不很清楚,问试剂公司吧,发一份我们的材料给你参考.此外还可以考虑离子交换去分离,还可以用 HPLC

我将一个螯合剂与单抗相连，螯合剂的分子量大约 500,单抗的分子量是 17kd，连接以后有什么好的方法可以将它们分开呢？

如果是要分离 500 和 170kd（原来的也许有错，抗体分子量不会只有 17kd 的），那可以选择 G25 即可，如果样品很少，透析也是不错的方法，还可以用超滤离心管的方法，我觉得透析简单也适合你样品，要过柱子会麻烦点，何况你样品少

我是一名小硕，不是基础的，但是需要用肿瘤抑素（tumstatin），tumstatin 就是由胶原 IVa3 链的中间 3 股螺旋区域 C 一端 12 个氨基酸和非胶原区 1(NC1)232 个氨基酸，共 244 个氨基酸组成，相对分子质量约为  $28 \times 10^4$ ，编码核苷酸由 738nt 组成。在有证据表明，基质金属蛋白酶-9(MM-9)能有效切割胶原 IVa3 链，释放出 tumstatin。现在也有人重组人 tumstatin。我想用 MM9 切割胶原获得之，但是之后如何提纯呀

我猜测你想切胶提取，只是这样得到的很难有活性，而且量不多，查文献看看，其实要分子量不大可以考虑 HPLC。切胶后只要切下那没染色的区带，捣碎用缓冲液提取三次就可。

精制时菌体被破碎后，如何能快速有效的去除蛋白水解酶啊？

通常的配方里有酶抑制剂，EDTA 等都是这个目的。你按实验书上做即可。这样破碎用的配方很多地方都能找到

我是一个超级菜鸟，以前没做过基础实验，现在需要纯化一个天然蛋白，160KD，等电点大概在 4.8~6，我们实验室新买了一个法玛西亚的 AKTA100 的沉析系统，配了一个 DEAE FF 的柱子，准备用这个系统做，可是好象摸不到头脑，不太知道怎么做

先看看纯化的书，他们一般会送一些纯化的手册会有帮助，此外查帖子前有推荐做纯化需要读的书，这样会有帮助，几句话指导不了你实验，你看文献和实验书，只有一个 DEAE sepharose FF 很难完成你的纯化工作

您好！我有个蛋白 21KD，等电点 5 左右，纯化后想用 HPLC 分析纯度，应该选用什么样的柱子呢，是反相柱还是疏水柱？流动相又该如何选择？我这方面做得很少，希望您能多多指点，非常感谢！另外，蛋白质冻干粉是 4 度还是 -20 度保存好呢，上网查了一下，好像没有一个确定的说法。望您不吝赐教，谢谢！

通常看<色谱>这杂志，里面应该有很多蛋白分析的文章，你照其中的做即可，当然是选择反相柱，流动相也差不多固定的，需要摸索，蛋白加甘油 -20 度肯定比 4 度好，当然如果只要保存时间不超过一天，那 4 度也可以。其实关键还是看样品

蛋白冻干粉里没有加甘油的,在-20 度长期保存对活性有影响吗?

冻干的话当然不能加甘油,那样干不了,-20 度也看什么蛋白,大多在时间不太长应该可以,但是要长的话还是冻干保险

问一下大侠，有听说 Secpack C18 的柱子吗？我做分离需要用这个柱子，可我在网上查不到这方面的资料。初次接触有关色谱的实验，很多东西都不懂，诚心向大侠请教！谢谢！

你没柱子都应该有一些材料的,此外这是反相碳十八柱子,你可以参考别的 C18 的柱子用就可以.或者问厂家.

楼主你好，我 monoQ 强阴离子交换纯化的一个电泳纯的酶，条件是 pH4.8 的柠檬酸缓冲，摸索条件的时候试到 3.8 左右就挂不上柱子了。但是在送出去跑等电聚焦测酶的等电点时，跑出来的是在 7-7.5 左右的一团，marker 的范围 4.45-9.6，为什么等电点在 7 左右的酶在 pH4.8 还可以挂在 monoQ 上面？

其实蛋白表面电荷分布不是均匀的,所以也许有这样的可能,不过我倒是没遇到过

反相后蛋白中的乙醇没有办法除去。我用离子交换时它吸附不上(蛋白 PI4.5, 我用的 PH9.0、10nM 的 PB 也结合不上，DEAE 和 Q 都用过，一过柱子就穿透)，疏水的苯基柱、C4/C8 也都用过要么结合不上，要么水洗不下来。现在只好用分子筛，但最后浓度太低，而且上样量太少，超虑浓缩又样品太少。不知各位有没有更好的除乙醇的方法

乙醇很容易挥发而且是小分子,直接透析，除盐柱，超滤也可以去。如果你样品太少,那就冷冻干燥也可以

chromatography 兄你好!我想纯化酶!用的柱材是 Phenyl-Sepharose Concanavalin A-Sepharose 和 Dye-Matrix Green.我不知道去那里买,你能给我推荐一下吗? Concanavalin A-Sepharose 我们实验室以前有,是旧的处理一下能用吧?谢谢了

前者两个我们公司就有,www.wsac.cn,而 后者没用做过,sigma 公司也许有,GE 公司也有前两个.最后的看你用量大小,其实那个不难合成,旧的可试试,能挂住你目标蛋白就没问题。

挥发的话不能彻底啊,这样不能直接用于做体内活性吧,也不能直接用于注射人体啊,透析也不能彻底,而且也有稀释的作用。冷冻的话好象冻干机不行吧,冻干机受不了这么高的有机溶剂啊,我的样品中有 55%的乙醇啊。我们这个产品目的是要用于直接注射人体

超滤或过除盐柱,再冷冻干燥没问题

我想他可能是想应用于生产吧,虽然大家说的这些方法在实验室都可以,但那些超滤和挥发用在生产上还是不很理想,要是能用离子交换是最好了。想问一下:你的蛋白是不是经过修饰了,加了什么烷链??是 PEG 修饰了??如果是 PEG 修饰了,可以问下这个做这个的高手。也希望做过相关技术的战友说说自己的看法

超滤或除盐柱在工业化上也常用,没什么不理想的,离子交换还会带来盐的问题

纯化中遇到了问题,请您帮忙,问题 1:我要纯化两个蛋白,PI 值分别为 6.63 和 7.72,用的是 PROMEGA 的 Megne His protein purification system,他的 binding/wash buffer 和 elution buffer 的 pH 值都是 7.5,我想目的蛋白会不会在这种条件下形成沉淀?那么怎样调节 pH 值来避免,用什么样的酸或碱调节,调到多少呢?问题 2:目的蛋白是带信号肽分泌到细胞周质的,提细胞周质的液体 pH 值是 8.0,蛋白会不会也形成沉淀呢?这个怎么调节呢?

你可以自己配缓冲液也可以,当然你可以取你蛋白看在不同 pH 下保存一段时间看有没有沉淀就可以知道是不是 pH 的问题,通常用到 pH8.5 应该没问题。用什么关键看它本身是什么缓冲体系,否则调后就没缓冲能力了。当然你可以自己配新的缓冲液。此外如果是杂带最好纯化洗脱做优化,还要注意处理样品的条件,避免降解或断裂,导致难分离

你好!我是新手,刚做到蛋白纯化。我们实验室一般都是先用溶菌酶裂解,然后直接就上柱了。大部分人的都能纯化出来,可我和一师兄的就是不出来。肯定是表达了,跑电泳,洗脱液里基本没有目的蛋白,而在裂解液离心后的沉淀里,有大量蛋白。这是不是说我们裂解的不够充分,不同的蛋白,裂解所需要的条件不一样所致?下一步,我想在溶菌酶裂解的基础上,再用超声的方法进一步破碎,你看行不?

那你裂解后离心的上清如果跑电泳没有目标蛋白或者浓度太低,那说明是裂解的问题,当然还有可能是表达是包涵体形式的,你可以用 8M 尿素溶解你的沉淀,离心取上清跑电泳,还是没有目标蛋白,那最好超声破碎,如果有,那也许你需要在变性条件下过柱子洗脱。

我用 8M 的尿素溶解沉淀后,上柱的,洗脱后,所有的洗脱液里基本没有或及其少量的目的蛋白,对 8M 的尿素溶解沉淀的沉淀跑电泳,结果发现大量目的蛋白。我个人认为是裂解不够充分,您看有可能吗?我准备先用溶菌酶裂解,然后超声或者反复冻融(利用液氮,可

能较快) 您看可行不?

那你超声看看,我觉得如果尿素溶解有目标蛋白,说明应该是包涵体的可能性大,洗脱也必须是在变性条件下进行,你也可以用盐酸胍溶解再出柱子试试,如果你超声和没超声没区别我觉得不是破碎不完全,而是吸附太少,或者没洗脱下来,自己去排除一下看看具体原因

目的蛋白是包涵体。看来也不是破碎不完全的原因。今天对收集的菌体先用溶菌酶裂解 1h 后,又利用液氮反复冻融了几次,可结果发现,目的蛋白大部分还是在 8M 尿素变性的沉淀中!我觉得现在问题的关键是无法把目的蛋白从沉淀中抽提出来,8M 尿素是溶解有目标蛋白,但是量很少。您看,我下一步该怎么尝试?

改用盐酸胍溶解,看看分子克隆上面都有

我现在做一个 GST 融合的包涵体蛋白,是膜蛋白,在超声破碎之后很难用 8M Urea 溶解,用 6M 盐酸胍溶解之后再透析复性,可是都沉淀出来,电泳看出我的目标蛋白都在沉淀里面。可是过 GST 亲和柱必须得复性之后,现在该怎么办呢?我都不知道要如何继续了。请师兄多指点指点,从菌体破碎到包涵体复性,有没有好的建议?

复性缓冲液加甘油和 DTT 看能不能溶解,复性做的很少,你可以参考文献或一些纯化的书。

我要从芹菜中分离 CELI 酶,在一篇文献上看到包括以下过程:得到的芹菜汁用硫酸铵沉淀,然后透析,然后: Step 2: Concanavalin A-Sepharose 4B affinity chromatography, Step 3: DEAE-Sepharose chromatography, Step 4: Phosphocellulose P-11 chromatography。Step 5: Phenyl Sepharose CL-4B chromatography。Step 6: Mono Q anion-exchange chromatography。Step 7: Superdex 75 size-exclusion chromatography using the SMART system。结合结果帮我参考一下以上实验步骤能否简化一下

没做过不好说,我觉得还是重复的好。不过看你的实验条件和需要的纯度,其中 mono Q 没进口机器是做不了的,这个纯化步骤真多,如果你选择硫酸铵沉淀,可直接先上 Phenyl Sepharose CL-4B chromatography,然后再上 Concanavalin A-Sepharose 4B affinity chromatography,再上离子柱子,最后可用 Mono Q anion-exchange chromatography 及 Superdex 75 size-exclusion chromatography。

我在原来 8M 尿素(实验室原来的做法仅仅是加了尿素,磷酸二氢钠和 TRIS)中又加了 DTT 及少量甘油,结果包涵体溶解了大约 80%,而 10M 的尿素溶解了将近 90%。由于是第一次作,都是按实验室原有的方法作的,他们的方法也不大好用,我认为也不全面。还有,您说利用盐酸胍溶解包涵体,然后上柱?我这样理解对不对?如果是这样的话,洗脱液还是原来的 8M 尿素所配的 pH 剃度洗脱液?另外,见你在其它的帖子上说:“包涵体的洗涤用通常的方法我试过都不是很好,因为那些洗涤的方法都没有办法把包涵体中的杂质去掉,所以最有效的方法是先 6M 盐酸胍溶解,然后再分别用水稀释到 4M,3M,2M,1M.这样得到的沉淀跑电泳,最后哪个浓度得到的包涵体纯,那就用那个浓度,这样可以把包涵体中的杂质去掉,相当于分级沉淀,这样得到的包涵体比通常洗涤的更纯。”您说的洗涤,是在哪一步呢?不大理解。谢谢赐教!

无所谓，能溶解就好，我觉得盐酸胍变变更彻底，所以可选择盐酸胍。我说的就是溶解后洗涤包涵体，这样有时候不过柱子就可得到比较纯的蛋白。

我今天纯化出来了，而且效果还不错。看来在尿素中加的 DTT 以及甘油很管用。本科学的是食品，现在学分子生物学，很多东西都没接触过，都是第一次做，所以很多问题很幼稚。但是，您总是不厌其烦的悉心讲解，不胜感激！再次感谢！

能解决问题我也很高兴

楼主色谱兄：呵呵，你介不介意把回答笑一笑的邮件给我发一下呢？我也面临溶解包涵体不充分的问题，洗涤用的是低浓度的尿素，也是洗涤的不干净

用加甘油和 DTT 的尿素或者盐酸胍去溶解应该比原来的强,我没发什么特别的邮件普通的洗涤是不行的,最好先溶解,然后降低变性剂浓度,分级沉淀应该会好点,详细方法见:包涵体的洗涤用通常的方法我试过都不是很好,因为那些洗涤的方法都没有办法把包涵体中的杂质去掉,所以最有效的方法是先**用 6M 盐酸胍溶解**,然后再分别用**水稀释到 4M,3M,2M,1M**.这样得到的沉淀跑电泳,最后哪个浓度得到的包涵体纯,那就用那个浓度,这样可以把包涵体中的杂质去掉,相当于分级沉淀,这样得到的包涵体比通常洗涤的更纯

我想从我的蛋白中除盐和 DTT,我的蛋白分子量为 2KD,请您给点建议?我用截流分子量为 1000 的透析袋可以么

2KD 应该不算蛋白了,如果真是这样的,截流分子量为 1000 的透析袋估计不会很好截留的,但是你可以试试,也可选择 G10 或琼葡糖凝胶 G15 应该也可以。

我们实验室有 bio-gel p-4 聚丙烯酰胺凝胶,您说这个我可以么

你看看它的分离范围,如果你的分子量是 2000.那选择它是不行的它上限是 4000,就是 bio-gel p-2 也不行,只能选择葡聚糖凝胶 G10 或琼葡糖凝胶 G15

我的蛋白分子量接近 2000,我看 Bio-gel p-4 的排阻下限是 3600,分级范围是 500-4000,我的目的就是除去 DTT 和氯化钠,这是不是属于分组分离,如果用 Bio-gel p-4,我要保留的蛋白是不是必须在 3600 以上,才能把那些杂质除的干净?我听实验室的老师说 G-10 和 G-15 不稳定,他建议我还是用 Bio-gel p-4

对,除盐当然需要蛋白在排阻范围外这样才好,Bio-gel p-4 颗粒细而且流速慢,当然你可以先试试吧,我觉得是比较难的,除非你上样特别小.G-10 和 G-15 不稳定这是不应该的

最近正在做纯化,毕赤酵母分泌表达,蛋白大小 2.7KD 没有带任何标记.文献上提到用离子交换分离,不过酵母发酵液成分太复杂了,如果直接上柱的话不知道可否,还有这么小蛋白给位一般都是如何脱盐和浓缩的呢?还有给位有谁用过等电点沉淀法直接得到目的蛋白的吗?

应该可以直接上离子交换的,小分子的物质最好选择碳酸氢铵或者甲酸铵做盐,这样浓度不太

高冷冻干燥可以去掉大部分的盐,同时也可以浓缩.等电点沉淀简单,只要你把 pH 调到等电点附近,放置几小时,看看有没有沉淀,离心收集沉淀即可,但是蛋白不稳定或者浓度不高这样的方法都不适合

色谱兄:最近做实验遇到了脱盐的问题,蛋白粗品过完离子交换后,要脱盐,但目的蛋白分子量较小约 1KD,不知道如何做?我的设想是利用我们实验室现有的 Bio-rad 的 P2 胶来做根柱子进行脱盐,不知道这样做是否合适?如果做的话,柱子需要多大规格?如果做成 FPLC 上用的柱子,需要什么条件?柱子规格和什么样的装柱器?

最好选择挥发性盐如碳酸氢铵或者甲酸铵,冷冻干燥可去,也可用旋转蒸发的方法去掉。否则除盐非常麻烦,Bio-rad 的 P2 胶颗粒非常细,流速慢,能不用还是不用的好

我用的表达培养机是 BMGY 和 BMMY 成分主要是 yeast extract, peptone,无氨基酸酵母基本氮源 YNB,磷酸钾缓冲溶液,生物素.没有专门添加盐.另外我老板不给买我想要的 Sepharose FAST FLOW 离子树脂,不知道从哪拿来些离子树脂让我用.我现在比较迷茫看见文献上说,树脂用前都要经过好多预处理,还有静态实验,我想问下对于未知的离子树脂预处理的方法如何,参考公司产品离子树脂的处理方法可以吗?还有个弱弱的问题,不知道您是否做过微滤,我想问下 Microcon 微滤柱它的截留分子量如 3000 指的单位是按分子的摩尔质量计算而言呢?还是指道尔顿单位呢,我的蛋白 2.7KD 可以用它来脱盐浓缩吗?还有透析带上的截流分子量的单位我也不是很明了,到底指的是道尔顿还是别的什么的呢?

没怎么用过树脂纯化蛋白,我觉得你可先试试,但是你的东西分子量不大,应该可用。3000 应该是道尔顿,这些微滤柱及透析袋都没办法截留你的样品,最好选择挥发性盐如碳酸氢铵或者甲酸铵做盐,旋转蒸发或冷冻干燥可去。

我没表达清楚我的意思,我也是想通过离子交换柱来分离我的目的蛋白,只是老板不给买现成的柱子,需要自己买了离子交换树脂来填装的.还有问题就是您在做离子交换的时候预除了柱子用的平衡缓冲是如何选择和确定的呢?是说买现成的柱子的话,厂商会提供相关的资料还是需要自己摸条件的呢?

都需要自己摸条件,你可以按文献做就可以,或者参考别的纯化文献或者实验书

我是一个新手,现在需要对兔血清 IgG 进行纯化,我知道用 protein A 柱比较好,但是由于实验条件有限,我手头只有 DEAE-纤维素。我也查了一些网上资料,但是现在我还有很多问题很迷惑,想请教你一下。我想知道,起始缓冲液用 PB 液还是 PBS 液好一些?它们的浓度和 PH 值是多少的比较好?还有我用的柱子是 1.6×30 的普通的 Z 型层析柱,那么加样量多少合适?是不是加的量跟蛋白的浓度有关?那浓度是多少合适呢?还有我想用梯度洗脱,那么洗脱液除了起始缓冲液之外。另一种的浓度和 PH 值是多少合适呢?

最好是参考一些文献做,我没做过这方法。开始可选择 PB 液,具体的 pH 还是参考文献,如果是 1.6×30 柱子,可上 200-500mg 蛋白应该没问题,浓度无所谓,但是最好别太浓,血清稀释 2-3 倍上 10-30 毫升,先少做点。其他的我很难想,你只能根据文献或实验书做。

我曾在文献上看过用钼酸钠可以沉淀蛋白质,请问这种做法的原理是什么,如何来操作呢?

这种方法和 TCA 法有什么不同呢？

没做过,我想主要是重金属沉淀蛋白的原理吧,也许特异沉淀一些重金属敏感的蛋白吧。

你好!我的蛋白已纯化出来,但因为是包涵体表达,所以是变性后纯化的。现在拟作复性,虽然论坛上有很多相关帖子,但是由于从未接触过此类问题,总觉太过笼统,不知如何去从

稀释复性后可超滤或者过离子柱子等浓缩即可,也可以直接在镍柱子上做复性,有很多这样的文献或材料

你好,想请教一下有关血清免疫球蛋白提取的问题,现在我打算用 Protein G Sepharose or Agarose Fast Flow,问题是目前国内外有没有预装柱(beads and column together),适合少量大批的提取,平衡柱子相对简单?哪几个公司的好些?

当然有预装柱,其实蛋白 a 琼脂糖凝胶也可以,Protein G 的少有国产的,蛋白 A 的 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 下就有.此外如果想得到特异结合抗原的抗体最好把抗原偶联用免疫亲和的方法去纯化。

我用尿素溶解了一个包涵体,透析复性怎样检测有没有尿素残留呢?我这个蛋白是没有任何标签,也不是融合蛋白,我要是过柱纯化该用什么填料呢?

那你查查尿素是怎么检测的,何况即使有点也没关系,反正你要上柱子,交换了就没什么影响,可以选择离子交换疏水来浓缩纯化,再配合凝胶过滤,都是常规的方法

你好!我打算用 GST 凝胶树脂离心纯化带 GST 标签的重组蛋白(也带 HIS 标签),然后用肠激酶切割。但是我不知道用什么方法去除掉肠激酶,你公司的胰蛋白酶抑制剂琼脂糖可以吗?另外我想知道你们的 GST resin HP 离心后会不会很难沉淀下来啊?

肠激酶是可以胰蛋白酶抑制剂琼脂糖去除,我们的 GST resin HP 很容易沉降.不用离心都行,所以离心更没问题.而且这个填料是干粉的,不需要平衡,直接和样品混合就可以,方便而价格又很便宜.对价格敏感的应该是不错的选择,目前我们已经做出更全的这类填料,可在 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载下经济型产品目录

请教楼主两个问题:一是用 SDS-PAGE 分离的蛋白质能用来作 ELISA 吗?二是 SDS-PAGE 分离后的蛋白切下目的带后电洗脱,再跑电泳,目的带基本都看不见,怎么样才能提高分离效果呢?

1 应该是可以的,二,看不到我想也许浓度太低,加大上样量或者提高浓度

请问各位老师:离心机 g 与 rpm 是什么关系?看文献有这种表示法:800gr/m 不知道是什么意思.请各位老师帮忙解答,先谢谢了!

具体的算法一般实验书上都有,g 为相对离心力= $1.119 \times 10^{-5}$  次方  $\times r \times$  转速的平方.rpm 应该是转速.具体的算法见<生化实验方法和技术>第二版,486页

如果用 sephadexG25 来做脱盐柱的话,那可以吗?如果行的话,我该用多大规格的柱子来自己做呢?(好在 FPLC 上用)

如果你目标蛋白的分子量很小,小于 sephadexG25 分离范围上限 5000,那就不能用,自己查材料看看该选择 G10 还是 G15 吧,通常这样除盐柱子 1.6x20cm 就可以.当然也看你要处理的量,通常可以上 20-30%柱体积,通常选择短粗柱子,看你的体积或填料再选择柱子.如果要连 FPLC 最好问厂家,需要配相应接口.

请教你一个问题, 1,为什么最近我们 5L 罐发酵的大肠杆菌破碎液难以离心澄清?以前一般 10000rpm 30min 都比较澄清了,现在 15000,2 个小时的效果还不理想. 2,我们在破碎液里加料 1%的 triton,离心一个小时,效果还差不多,但是由于这些样品要走完 gst 亲和胶后,用纯品做细胞试验,据以前的师兄做试验说对细胞影响很大?而且个人感觉 triton 黏黏的,很难去除呀 不知 chromatography 大师又何建议

过亲和柱子应该可以去掉的,通常不会和蛋白结合的,如果影响大不好去,那可不加试试。

我有 3 个蛋白 14kd.12kd.9kd 的混合物,请问怎么才能分离得到 9kd 的? 我用 milipore 的 10kd 超滤管没有用,没办法将 9kd 的离下去.请多给点线索.谢谢

选择高分辨率的凝胶过滤的填料或者预装柱,不过分子量差不太多,很难用凝胶柱分开.此外也可以选择高分辨率的离子或者疏水柱子试试。

我现在纯化的是一种与白蛋白融合蛋白,酵母表达,现在走了离子交换和疏水两根柱子,纯度可以达到 90%。发酵出来后,此融合蛋白会有降解,构成了体系中的主要杂质,大部分分布在 10K~85K 之间,其中的条带数量比较多,大概有 6 条,分子量小的有 10K、45K、50K 左右的,我的目的蛋白是 85K,应该是最大的.问题如下,希望能听到有创意的建议: 1、下一步精纯能否给些建议?我最近尝试了 Superdex 75 预装柱, CV=24ml,分离范围是 3K~70K,但是效果非常不好,基本没有分开,上样量或许大了些,500 微升,我考虑试试 100 微升,是否会有好结果? 30K 的超滤也试过了,但是没有什么效果,还想试一下 50K 的; 2、关于内毒素的去除,能否给一些建议,以前没有做过,最近看了一些资料,但是还是想听听专家的意见,最好能给一些相关方面很有参考价值的文献或网页?蛋白是分泌表达,按理说起始内毒素应该不多(没有测过),关于后续的操作,比如无菌室、比如柱子的预处理等,能否给一些建议,还有就是那些柱子在纯化的同时对内毒素的去除有较好的效果那,比如 DEAE、亲和填料等?

有时候凝胶柱子的效果是让人失望的,但是关键还看填料的选择,凝胶柱子最理想的是你的目标蛋白走外水体积,而杂质都走内水体积,我们可按你的要求合成你需要孔径的琼葡糖凝胶过滤填料.此外你可以考虑优化洗脱的条件或者选择 H P 级别的填料进行精细分离,此外可以加蓝色琼脂糖凝胶亲和或者金属螯合铜离子亲和去纯化,这样也许会有更好的效果.去内毒素如果你是生物大分子,同时也是酸性蛋白,用离子柱是难去掉的,实在没别的办法那只能选择去内毒素的亲和填料, www.wsac.cn 资料下载中有说明书和用法,我们经验是它是特异性比较好效果明显的方法.曾经用于蛋白,抗体,核酸,多糖,病毒等内毒素的去除,无论规模大小,效果都不错,样品收率高

此蛋白不带任何标签，据前任纯化人员称，蓝胶和 Ni 柱都用过了，各种离子交换也都基本用了，主要就是 45K 的那条带——白蛋白的特征降解带，没有一种填料能有效将之除去的；当然，我还会亲自再试试的:) 还有一个问题，发酵液中有蛋白酶，目前知道的有羧肽酶 Y 的存在，或许会顺序切掉 C 端的氨基酸，这还是个很头疼的问题，您再这方面有经验吗，或许可以给我一些有用的建议,谢谢~另外，能介绍以下无菌操作的细节注意事项吗？最近要进行计划了，一旦纯度达到要求，就要进无菌室，早做计划会比较安心，麻烦请多指教

其实有的时候虽然试过了,但是没优化不一定就说明这方法不能用,虽然凝胶柱子最直接,但是上样量小,有时候也分不开,所以我只能说到这样的地步,需要多做优化条件才能解决.可以选择高分辨率的填料或者用很精细的阶段洗脱的方法.酶的问题你可以看看有没有抑制的方法.我了解不多,你看看酶的特性.无菌操作我也没太做过,一般的操作流程中应该有,如果无菌操作内毒素还不合格,那也只能用亲和的方法去除,它倒是可以没无菌条件在超净台中进行即可

最近做阳离子 CM 纯化,在 pH5.0 和 5.5 的时候,发现的一个非常奇怪的问题,在 pH5.5(20mm 的醋酸缓冲液)的时候,发现穿透峰和吸脱峰都有目的蛋白,上样量是 6mg,应该不存在上样量大的问题,可是为什么会有这样的结果呢?难道是填料的问题?用 5.0 的缓冲液 20mm 的醋酸缓冲液,相同的上样,穿透峰和吸脱峰,结果又是这样的,部分杂蛋白即出现在穿透峰,也出现在吸脱峰(2M 的 NaCl),目的蛋白倒是挂在了上面,真是奇怪的问题,郁闷啊!下一步我该怎么办?

很正常,因为填料吸附有效率的问题,不能一点穿透都没有,除非你流速很低或者循环上样.你试试降低流速会不会好点,如果没改善,那你选强阳柱子或者选择载量高的填料

我的流速很小大概 0.5ml/min,我的目的蛋白的等电点大概在 4.8 左右,从理论讲应该是穿透的,但是 5.5 的穿透中,大部分穿透,一部分挂上了,我 感觉很困惑,或许是填料有问题?我们的填料是别人剩余的,开始用时发现他保存在乙醇浓度较高的溶液中,因为 20% 的乙醇是淡淡的味道,而他的保存乙醇却味道很明显,会不会是这个的原因?而且上样不会有问题的才 6mg 呀!5.0 的却是大部分挂上了,相同的杂带出现在穿透和吸脱峰中,而且二者量很接近,什么原因?我个人认为是填料的问题,你认为呢?

如果是这样,我也觉得有可能填料载量不高才会这样,你彻底清洗填料或换新的试试, [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中有填料的清洗方法.你看看能不能好点

关于腹水中单克隆抗体的纯化,最近我想用 Protein A 亲和层析法(用的是 Amersham 的 HiTrap Protein A HP 1ml 的亲层析柱)从腹水当中把单克隆抗体给纯化出来,单抗的亚类是 IgG1,我查阅了一些资料,说是不同亚类的 IgG 洗脱液的 pH 值是不一样的, IgG1 要用 pH6.5 的洗脱液(我配的是柠檬酸-NaOH 溶液),经过常规平衡(平衡缓冲液为 0.1M pH8.0 PBS)、上样(重复一次)、洗涤非特异性结合杂蛋白、洗脱,收集管里事先加入 50ul 1M pH9.0 Tris-HCl,每管收集洗脱液 1ml,共六管.因为实验室条件有限,没有 AKTA,也没有上样体积很小的紫外分光光度计,就没有测 OD280,而是直接用 Bradford 法定量,发现洗脱液里蛋白量非常之低,反而穿透液里有一定量的蛋白.洗脱液经过对 0.01M pH7.4 PBS 透析过夜,PEG20000 浓缩后跑 SDS-PAGE(分还原和非还原),穿透液也跑,结果非常奇怪,洗脱液里一条带都没有,而穿透液里有一条单一一条带,分子量大概在 100KD 左右,更奇怪的

是还原和非还原没什么大的区别,只是条带位置稍稍有点不同。我的问题: 1. 是我的层析介质选错了吗? 为什么挂不上柱子? 还是我选择的缓冲液 pH 值不对? 2. 穿透液只有单一条带,是不是柱子反而把杂蛋白给挂住了呢? 还是我的腹水样品本来就纯,里面就只有单抗一种成分呢? 3.虽然有条带,但是分子量不是很对(IgG 分子量应该是 150KD 左右吧),而且存在于穿透液当中,是否可以通过 WESTERN BLOT 鉴定其性质呢? 如果鉴定是单抗的话是不是就可以直接拿来用了呢? 4.接着上一问,如果穿透液里的东西可以直接用,那是不是连腹水都可以不过柱子,而直接拿来用呢?(比如耦联到 CNBr 活化的 Sepharose 4B 介质上用来亲和层析抗原)卡在这一步就无法进行下一步,恳请指教!

实验是没问题,位置是很奇怪,通常抗体的重链好象是在 5 万多的位置,而轻链两万多.也许是因为浓度太低,你可以浓缩样品再试试就知道,总之 9 万多应该不是 抗体.洗脱没有有两个原因,一是本身吸附弱,所以没挂好,二是可能没洗下来,你可以用 pH3 缓冲液洗试试,如果还没有,那说明没挂好,可以在平衡缓冲液中 加盐到 2M 有利 IgG1 吸附. 2.这问题上上面已经说明,3,一样问题,你可以用 ELISA 检测活性.4,穿透可以接着上柱子,.我觉得你最好纯化好抗体再偶连效果会更好点

以前实验室里分出过一种蛋白,等电点在 4 左右.可是为什么我用 DEAE-A50 的胶,缓冲液为 0.05M 的 NH<sub>4</sub>AC, PH8.0 经过简单洗脱就可以洗脱出来呢? 而且产量较大.在简单洗脱之后,我用了梯度 0.05M NH<sub>4</sub>AC PH8.0 和 1M NH<sub>4</sub>AC PH5.0 大约经过 6 0 0 M L 后,又洗脱出一蛋白. 分子量和前面的相似.我现在很迷惑,不知道是否为同一种蛋白

是不是同种蛋白电泳鉴别就知道了,或者测定活性,何况穿透有目标蛋白并不奇怪,因为可能结合不完全或者没挂的部分

请问您是否用过 HiTrap NHS-activated HP(Amersham Biosciences),我打算把已知多肽与其偶连,然后用细胞裂解液过柱,获取与已知多肽相互作用的蛋白,请问一般需要裂解多少数目的细胞

我觉得你最好选择环氧活化的填料,因为这样没非特异吸附导致假阳性.而且更牢固,不容易脱落.至于多少细胞我不清楚,因为和你配基密度,作用力强弱,含量都有关系,只能自己摸索.如果你已经买了,那就没办法,你可先用试试。

安马西亚 G-200 的缓冲液配方和使用说明书?急用的!!!表达的蛋白总是纯化不出来的?

这个说明书好象没有,缓冲液用磷酸盐缓冲液就可以,纯化不出来那要看你用的什么方法,具体点,否则帮不了你

想请假下你,我通过等电点沉淀法,分离得到了沉淀,经过 SDS-PAGE 也可以看出就是我的目的蛋白,不知道这样得到的蛋白纯度如何,如何检测纯度呢?是 通过液相吗,如果还需要进一步的纯化不知道应该采用什么方法呢,凝胶层析可否?被老板逼迫前一天要拿到纯品不然就回不了家了,谢谢!

纯度用 SDS-PAGE 就可以,你多上点样品,这样分析看看,此外也可以用 HPLC,如果电泳纯度都不好,HPLC 就更不好说,等电点沉淀容易没活性,注意温度和时间,进一步纯化可以用离子

交换,凝胶柱等,但是如果你沉淀不溶解,那下面就没办法做了

我现在纯化 pQE-30 表达的 6×His 融合蛋白,分子量大概 15KD,等电点约 8 左右,我用 6M 的盐酸胍溶解包涵体,上 Ni 柱,用 6-0M 尿素梯度柱上 复性,然后 20-400mM 咪唑梯度洗脱,所有缓冲液均为 20mM Tris-HCl, PH8.0,可是结果 Elution 中目的蛋白量非常少,sds-page 只有一条细线,请问,是否因为我的缓冲液 PH 接近蛋白等电点,所以溶解和瓜柱都受到影响?我应当怎样改进?谢谢!

听的很糊涂,sds-page 只有一条细线也许你是样品浓度不够,浓缩看看,变性条件下吸附量不会太多的,你可以提高 pH 到 9 试试,也可多用点填料,多上点样.

是否因为蛋白沉淀在层析填料上而影响洗脱?如果要改缓冲液 PH 值,该 7.0 左右好,还是 9.0 左右好呢?

7-9 都可以,但是太低 pH 作用力弱,高作用力强.我觉得 7 和 9 都可以试试.

我用一个 700 左右分子量的螯合剂与 160Kd 的蛋白连接.连完以后想除去过量的螯合剂.我采用的方法是过 sephadex-G25 柱(柱直径 5mm,长约 6cm)样品大约有 40ul.因为单纯螯合剂在 280nm 也有吸收,紫外检测只有一个峰,说明东西没有分开是吗?是我的方法不对,还是柱效太低?

40ul 太少了,也许检测器未必能检测到你的蛋白峰,除非你机器精度很高,我觉得超滤离心管应该是不错的选择,因为毕竟量太少了

请教 chromatography 有没有硫酸铵分级沉淀的方法手册?

你还是查实验书吧,例如抗体的硫酸铵沉淀在这些手册中都有.如免疫相关的手册,或者是生化实验书

我想问下,如果等电沉淀后还是需要过离子柱的话,那上清液不经过浓缩和脱盐直接过离子柱可否,不知道这样效果如何,还有想问下过离子柱的时候需要的一些缓冲液是根据什么配置的,PH 是如何确定的呢?过了离子柱后是否还需要过一下凝胶柱脱盐呢?还有我看有些文献上还提到最后过反相液相不知道是否是为了进一步纯化吗?如果不进行这步操作的化得到的产品纯度如何呢?

通常等电点沉淀蛋白很难保证不变性而很好溶解的,如果上清需要调 pH,浓度过高的话不稀释也没办法上柱子,能不能只有做了才知道,没办法预知,因为不同的样品或者不同的操作都不大相同,至于具体的条件也是这样,你按文献或者实验书的方法去做即可,而通常缓冲液用 10-50mM,pH 根据你的蛋白等电点而定,建议去读离子纯化手册或者相关实验书,在帖子中写过好多参考书了,过离子柱后是不是要除盐也看你自己的要求而定,如果你蛋白足够稳定那用 HPLC 也可以,但是这样只是分析多,制备不一定好用,因为难保证蛋白活性

我在动物体内提出的样品粗提液跑电泳可以跑出来 7000 左右的小肽,但是用 G25 分离纯化以后跑电泳,那个小肽跑不出来了,而,出现了个几万的,不知道怎么回事,.我是粗提液和纯化后的

样品跑在同一块胶上的,固定染色脱色的 条件都是一样的,所以应该不是电泳的问题

加大上样量或者浓缩样品,提高分离胶浓度到 15 或者 20%,电泳时间别太长, 前沿到 2 / 3 的胶处就可以, 免得跑出去, 或者因为浓度太低看不到

我正准备纯化一个蛋白,用的介质是 sephadex G150. 目的蛋白 29KD.我泡胶是用的 ddH<sub>2</sub>O, 洗脱的话是不是还要用双蒸水呢, 还是用缓冲液? 改用缓冲液怕改变凝胶的交联状态, 不用又怕对蛋白不好

你选择的填料分离范围太宽, 而且过软, 其实也许 G75 或者 G50 更合适你,泡填料和洗最好都选择缓冲液,这样避免填料收缩而影响效果

但我还有几个疑问, 我单纯用单抗、螯合剂(量与反应时相同)过柱, 在 280nm 可以检测到很好的吸收峰。但连接完的物质上柱在峰顶出现波动, 且洗脱比较慢, 有拖尾。是不是说我的柱子太短了? 这个方法能不能行的通? 700 分子量的螯合剂能不能用 sephdex G25 分开呢? 因为实验室没有 lz 所说的超滤离心管, 还是想采用过柱分离, 还请前辈解惑!

过柱子也行,只是怕你的样品太少不好做.理论上应该是没问题的.我觉得你样品少难检测

我是一外行, 请教大家, 在血清中的小分子蛋白, 质荷比 6000 多, 如何分离呢, 普通的电泳是不行的

HPLC 也许更好

请问楼主有关柱子的问题可以吗? 我的艾玛西亚的柱子 XK26/40 的柱子坏了, 然后我用一根相同规格的国产 Z 型柱装柱。填料是法玛西亚最好的分子筛柱料, 但是柱效与进口的柱子的柱效根本没法比, 请问是什么原因阿? 是因为柱内压的差异吗?

是吗,我没特别做过对照,我觉得如果柱子装的没问题那应该和柱子的头和底有很大的关系, 上学的时候曾经思考过,总觉得这些柱子设计不符合色谱理论,那样会影响分离效果,不或我觉得你加长点柱子也许能好点,国产柱子的转换头设计有点问题,如果是普通不带夹套和转换头的效果更不好,不知道型柱是怎么样的

我是新手,我做的是 3~4kD 大小的亲水性蛋白质,用的亲和层析 sepharose 4B, 但是分离几次后就分不出来了, 据我推测可能是配体变了性或是被冲下来了, 因此柱子失效了。我想多分些出来测结构, 而且要尽量纯, 但是琼脂糖很贵, 很浪费。有没有别的较好的方法分离我的蛋白?

亲和填料合成的方法不一样寿命也不同, 或者是再生不好也会导致寿命下降, 你可以仔细看看说明书, 亲和是不错的方法, 所以我觉得没更好的方案了, 不知道你是什么亲和填料, 可以选择便宜点的

我是做黑木耳中  $\beta$ -葡聚糖的提取纯化的, 我用碱提多糖经脱蛋白脱色后过柱纯化, 现在需要选填料, 我看文献上有用 DEAE-52 和 sephacrylS-400HR 的, 还有用 sepharoseCL-4B 和 Q

sepharose FF 的，还有用 DEAE sephadex A-25 一种的。我想选 DEAE sephadex A-25 一种不知道能不能达到我的目的？

可按文献做，只一步是很难达到目的的

DEAE sephadex A-25 不是具有离子交换和分子筛双重作用吗？若分子筛起不到很好作用那用它和 DEAE-52 还有多大差别呀？

其实 DEAE sephadex A-25 不是具有离子交换和分子筛双重作用对于蛋白而言没什么意义，因为蛋白根本进不了内孔，所以只有离子交换起作用，它和 DEAE-52 效果应该差不了太多，不过没做过，这些填料太老。如果有条件建议换它和 DEAE 琼脂糖凝胶吧。刚性好，流速快，可以在位清洗。很方便

弱阴离子交换和强阴离子交换有什么差别？我做的相关课题里怎么用什么的都有？请教他们区别在那里？

弱阴离子交换和强阴离子交换的差别只在它们的工作 pH 范围不，弱的不如强的范围宽，至于你文献里用这么杂是比较少见，没办法分析，毕竟没做过，你也别想这么多，一步一步来先重复看看

溶解后的包涵体过 Ni-NTA 的柱子，挂的还不错，我用的是咪唑梯度洗脱，在 50mM 时以及有目的蛋白（16KD 左右）了，100mM 时蛋白增多，隐隐的出现了一条杂带（40KD 左右），在 250mM 咪唑浓度时，目的蛋白基本都洗下来了，但是杂带也都洗下来了。还有，目的片段上下挨着很近的两条，是不是我离心的条件不严格（室温），目的蛋白降解了呢？直接跑包涵体的时候还是一条带（当然比较浓）。如果我要分离杂带和目的条带，首选离子交换还是分子筛呢？

我觉得很近的带也许是降解的等原因造成的，你可以纯化的时候多设几个咪唑浓度看能不能改善，或者在这之前用 0.5M pH5 醋酸缓冲液含 0.5% 吐温和变性剂洗 5 个柱体积，这样如果还没改善，那就留意你破碎条件，温和点，而且最好选择刚破碎的，这样都做不出来，那别的方法也很难说，毕竟变性条件下过凝胶柱子是分不开的，而离子柱子也很难说，只能做了才知道。所以优化亲和是最可行的方法

我是新手，我做的包含体蛋白，GST 融合，用 SKL 溶解之后却挂不上亲和柱。在变性剂条件下我试过 SP 柱也挂不上，疏水柱能挂上，但是洗脱时同样把杂蛋白一起洗下，没有纯化效果。不知是什么原因？

SKL 溶解之后加 1-2mM DTT 看能不能挂上，变性只能用尿素，如果用盐酸胍离子交换挂不上，疏水洗脱改阶段洗脱也许会好点

chromatography 你好：向你请教几个问题，一个是过分子筛出现负峰表示什么意思。再一个是我的 superdex75 柱子有点堵，我按说明书说的用 0.2M 的氢氧化钠洗过，也用 2M 氯化钠+1% triton100 洗过，但是流速还是上不去。据说可以用蛋白酶（胰蛋白酶，蛋白酶 k 等）消化一下，不知道是否有效，具体多大浓度洗，谢谢了。

负峰没什么意思,也许机器不稳定或者有什么干扰,你柱子流速上不去也许有点堵,因为这填料颗粒细,你可以倒冲看能不能好点,我觉得用酶效果不大

我用 0.5M 的氯化钠倒冲过, 并且换了上面的膜, 还是很堵。原来能走 1ml/min, 用了 20 轮左右现在只能到 0.4ml/min 了。而且还是 buffer 的流速, 水洗只能到 0.2

我觉得那就是堵得比较厉害,那用水慢慢洗几小时看看能不能改善,这需要在彻底在位清洗后做.如果没办法我觉得应该是柱头可能堵了,这就没办法了,预装柱都是有寿命的,所以样品和溶液一定仔细过滤,小心维护

我在样品脱盐时, 出现以下现象, 不知是何种原因造成? 现象: 上样时, 发现蛋白带沿着柱壁一侧下移, 形成一条狭长的蛋白带, 而且还能看见介质里有小洞, 形似沟流。严重影响了分离效果。上样之前, 介质表面平整, 也无气泡, 不知是怎么形成的?(柱子:index 200/95 介质: G-25-medium 葡聚糖胶)

如果是这样,那只能说明你的柱子没装好,不均匀或者没压好,有不就是柱的头面不平,上样冲得不平整才这样

还有一个问题是,我在走分子筛时,不小心忘了改柱压限制,结果发现在压力挺高的情况下走了一段时间,这样会不会导致分子筛中的颗粒压碎掉,从而导致分子筛的柱压升高?我用的是 sephacryl S-100, 还有就是这种情况下倒冲会不会好一些?

压力超过限制的压力,这样填料压太紧自然压力增加,填料倒不一定碎,但是一定要小心别超过压力限.还有不同的溶液黏度越大同样流速下压力越高,样品和溶液一定要过滤,避免独柱头的筛网这样也会使柱压增加,如果没必要的时候凝胶柱子最好别倒冲,即使要这么做也需要流速慢,避免影响分离效果.填料是有弹性的,所以流速降低一会自己就会好了

请教楼主,我们在用 hitrap DEAE FF 做蛋白纯化时,每次在高盐缓冲液洗脱结束,换回低盐时,总会出现一个洗脱峰,为什么这个峰为什么没有在线性梯度洗脱被洗下来,也没在高盐时洗下来,而在高盐降到一定程度时下来,我们的经验很少,望楼主赐教!

这个没留意过,并非所有的蛋白都有这样的现象,此外不知道你说的峰是不是蛋白,你多重复几次看看。如果还这样,我只能说那是由于高盐通常离子柱的疏水臂也是有疏水相互作用,这样水洗就是这样疏水性强的蛋白,你可试试高盐上柱,高盐洗平,水洗估计也有峰。

最近有个问题比较困惑,好郁闷啊!我的目的融合蛋白纯化表达在毕赤酵母上清中,纯化是我用到了疏水,用到了 DEAE, 用到了 CM,可是靠近目的蛋白的一条杂带,靠的很近,是降解带,怎么都除不去,你可有什么高见?

如果是这样很近的蛋白真没特别好的办法,我觉得根本的解决是要了解到底是表达时降解还是纯化开始降解,如果是前者改善发酵条件,如果是后者,需要降低温度,加抑制剂,尽快纯化。这样才是根本,而目前如果你已经如此可以选择 H P 级别的填料或预装的这样高分辨率的柱子去纯化,没更好的方法.或者优化条件看能不能把它们分开

我做的是蛋白表达,表达主要是以可溶性蛋白为主,蛋白有 6 个组氨酸的标签,最近我想用 HIS-TRAP 亲和层析法(用的是 Amersham 的 HisTrap HP 5ml 的亲和层析柱),蛋白缓冲液为 PBS 缓冲液,含 2%SDS,用 Bind Buffer 平衡(20mM 磷酸盐缓冲液,0.5MNacl,20mMimidazole),上样,洗脱(20mM 磷酸盐缓冲液,0.5MNacl,500mMimidazole),然后收集各管跑了个 SDS-PAGE 电泳,发现我的蛋白没有挂柱,为什么挂不上柱子? 主要考虑哪些方面的原因呢?我现在在这一步停止做不下去了,老板的意思是实在没办法用 S 柱和 Q 柱纯化,因为我马上就要毕业了,现在急的要死,恳请指教!

这样的问题讨论很多遍了,如果你挂不上那也许就得在变性的条件下去做,或者换作用力更强的填料试试,反正你没更好的方法,我们的客户曾经发现进口的挂不上而用国产的挂上的情况,所以你可以换个新填料试试,www.wsac.cn 资料下载中有填料说明书,看看会有帮助的,或者在变性条件下去做

再问斑竹一个问题: 1Tris-Hcl 缓冲液, 其中的 Tris 的洗脱能力是不是很强? 如果与硼酸缓冲液相比, 那么二者谁的洗脱能力更强一些? 2 相对与 CL-呢? 他们三者的洗脱能力又如何? 3 是不是硼酸是洗脱最弱的离子? 4 使用洗脱能力弱的离子来洗脱, 能提高改善分离度吗? 强弱离子洗脱的根本区别又是什么?

真没见过文献讨论不同离子的洗脱能力的差别,但是以前的书上是写过一些有关盐的影响,其实 Tris-Hcl 缓冲液远比硼酸缓冲液常用,何况不同类型的缓冲液对分离效果应该不一定很明显,所以我觉得没必要在这上面考虑太多,除非你要专门讨论这个问题或者做类似这样的课题,如果不是,那我觉得就没必要考虑这么多

楼主你好: 我的蛋白质溶液经 ConA— Sepharose 4B 亲和层析后, 然后透析, PAGE 可以跑出来的, 但\_20 度保存后 PAGE 跑不出来了? 请问我应如何保存? 谢谢

蛋白可能沉淀,所以离心看看是不是有沉淀,如果没沉淀你跑不出,那纯属意外,再跑几次看看. 如果有沉淀,那可以改变 pH 看能不能溶解,其实最好是能在样品中加 30%左右的甘油,这样也许可以避免这样的问题出现

chromatography 大哥你好: 这张图是我用肠激酶切割我的蛋白得到的 3 个条带。左边为 MARK, 右边主要包括 13.4KD,9KD 与它们之间的一个带。根据氨基酸序列计算得到 13.4KD 的 PI 为 7.1, 而 9KD 的 PI 为 8.29, 中间的那个未知序列, 所以无法知道 PI.我现在手上有 Hiprep 16/10 QXL 的阴离子柱, 我想用离子交换的方法, 得到 9KD 的目的蛋白。已知肠激酶切割的环境是 20mM Tris-Hcl、100mM NaCl,PH8.0.请问如何设计这个试验呢? 我是蛋白纯化的新手, 请尽量讲的详细点。

其实任何实验都是难预测的, 但是你可以把样品调 pH 到 8, 用 20mM Tris-Hcl pH 8 缓冲液平衡柱子, 上样, 理论上最好是能使你目标蛋白穿透, 别的挂在柱子上, 要是挂不住杂带那也是没办法的事情, 你可以选择高分辨率的凝胶柱试试, 遗憾的是这里根本没办法说多详细, 只能一边做一边讨论

韦兄，请问您一下，做 GST 蛋白纯化的时候，由于项目的原因，必需要用到混合的方法，然后将结合蛋白的凝胶装柱再纯化。您觉得在混合过程中的操作应该注意什么问题？哪些因素与上柱结合不同呢？另外，装柱时不用装柱器的话，要装得均匀致密，有什么技巧？

混合很少用，我觉得一定用的话不外乎注意样品的稳定性，如温度，pH，时间等，因为一旦 GST 部分没活性会导致挂不好，如果样品中有酶，最好加抑制剂，别因为时间长而降解，不结合主要的原因还是因为 GST 部分没活性，当然可以稍微加点 1 mM DTT 可以改善或者用新的填料或者新的样品。装柱子对于离子交换，亲和疏水等其实要求不高，而对凝胶柱子要求高，没装柱器也需要一次装填，然后让填料自然沉淀慢点，这样都可以装的比较均匀，其实任何时候都需要自己多摸索，同时看看理论书，自然就会提高更快，好运

有个问题，我用酵母菌表达一种蛋白，完了拿培养液上清液进行 SDS-PAGE 电泳检测结果除了 MARK 外，没有其他任何条带，连杂蛋白都没有，为此，极度郁闷，日日思虑到黄昏，夜夜失眠到天明。知道是什么原因吗？谢谢！我 PAGE 用的是 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶，总分子量约为 15KD 左右。样品煮沸和不煮沸我都试过了，不知道是出什么问题。杂蛋白怎么会没有呢，培养液离心会把蛋白沉淀吗？我用 12000 的速度，可溶性蛋白

也许你样品蛋白浓度过低或者你可以浓缩一下样品再跑电泳看看，离心不会使你蛋白没有的

师兄你好：我做的 GST 融合蛋白过了亲和柱之后纯度只有在 86% 左右，是在去垢剂的缓冲体系下的。接下来不知道还可以过什么层析柱比较好了。

最好是能从处理样品，纯化去优化，如果你纯度还不够看你目标蛋白和杂蛋白的差别，如果电泳带离得远可以考虑凝胶柱，如果近就选择离子柱，但是这都不是根本，最好是优化亲和纯化和样品制备

最近刚开始做纯化方面的工作，有很多东西不是很明白，我的目的蛋白是在毕赤酵母中表达的，分子量为 2.7KD，理论等电点为 8.22，我跑 TRIS-SDS-PAGE 后，杂蛋白基本都大于 10KD，我想如果直接用 sephadex G-25 FINE 来纯化可否将我的目的蛋白与杂蛋白以及盐分开呢，应该装多高的柱比较合适呢，我问师兄，他说直接上清液的浓度太低，我的上清中目的蛋白大概在 100-200MG/ML 吧，可是我的目的蛋白分子量太小有没有特别好的浓缩方法。如果直接一步凝胶层析效果不好的话，我要是先过离子交换层析柱的话，我应该选择那种阳离子填料较好呢，SP 还是 CM 呢？还有我的是平衡缓冲和上样缓冲，以及洗脱应该选择那种，多少 PH 比较合适呢？

如果浓度不够，最好先过离子柱，SP 就可以，具体条件看看通常的说明书都有，具体条件自己定，pH 可以用 6 试试。然后再上凝胶柱子，如果杂蛋白分子量大于 10000 那柱子短点就没问题，如 1.6x40cm 足够

你好！1 离子 DEAE 或者疏水上样量应该是多少为好？与浓度关系大吗？还是考虑上样量就好，如果蛋白质浓度在 1-2 g/L 时？2 如果上样量较少做线性洗脱时会不会使峰形较差，进而影响结果的分析？3 有可能在大的上样量做线性洗脱时效果会较好吗？

通常按 10-20mg/ml 填料上样即可，和浓度关系不大，1-2 g/L 也没问题。上样少分离效果好，不会

差的,多反而效果不好,特别是做线性洗脱.我觉得最好选择阶段洗脱更细致,不过还是看你的样品和习惯而定,工业化用阶段洗脱多

我做的是带 his 标签的分泌蛋白,取细胞培养的上清过镍柱纯化,我是新手,因为实验室一位师姐刚做过,所以把 protocol 给我了。我做了两次,可是都失败了,老板那边催的紧,我真的郁闷死了。你可以帮我看看哪里有问题么 1.首先我把样品与 200mM NaCl,10mM b-巯基乙醇,10mM 咪唑混合。2.镍柱是新的,用 0.1M 的 niCl 过柱,3.之后用平衡液 1: 5mM 咪唑,10mM b-巯基乙醇,200mM NaCl (ph7.4 的 PBS 配);加了 10 倍柱体积,4.上样(重复了一次,共两次)5.用平衡液 1 洗 10 倍柱体积。6.用 10mM 咪唑,10mM b-巯基乙醇,200mM NaCl (ph7.4 的 PBS 配)洗 20 倍柱体积。7.加洗脱液:500mM 咪唑,10mM b-巯基乙醇,200mM NaCl (ph7.4 的 PBS 配)室温震荡 10 分钟,收集三管蛋白。我第一次做时,洗脱下的液体直接就有明显的沉淀,不知道是否代表蛋白量大呢?但是 SDS-PAGE 跑完,考染没有条带,除了 marker,连杂带都没有。考虑可能是蛋白样品太少,我又作了一次,样品量增加了 5 倍,根据同学的建议把用于混合样品的咪唑改成了 5mM,即样品与 200mM NaCl,10mM b-巯基乙醇,5mM 咪唑混合。其他不变,可是这次做出来收集的洗脱液中一点沉淀都没有,SDS-PAGE 后考染除了我做对照的样品过柱两次后的液体有杂带,整个胶上 都有一条模糊的带,和我的蛋白大小类似,不过连 marker 和刚才说的对照的那 2 条道上也有。western blot 是有蛋白表达的。但因为我要做 n 端测序必须要考染。我的蛋白的等电点是 5 左右,具体我的问题出在哪呢

不知道你用的是什么填料,我觉得即样品与 200mM NaCl,10mM b-巯基乙醇,5mM 咪唑混合中的 10mM b-巯基乙醇及其他的溶液中最好改为 1mM,因为普通镍柱难耐受而且会影响吸附,我觉得你还是彻底清洗柱子,然后上样洗平后可以取点填料直接加电泳缓冲液煮,离心用上清跑电泳看有没有你的目标蛋白,如果没有需要换填料.通常可溶性蛋白完全不需要加 b-巯基乙醇.你去掉再做看看.我怀疑用你的方法镍柱子会变褐色或黑色,肯定挂不上蛋白

我的蛋白用的 QIAGEN 的 NI-NTA agarose 柱过柱纯化的。蛋白以包涵体形式存在,用 5ml 的 Buffer B 溶解后过柱,4ml Buffer C (洗去未结合的蛋白)洗两次后测蛋白浓度为 0mg/ml,再用 0.5ml Buffer D (洗脱带一个 His 标签的蛋白)洗四次,收集标本,测蛋白浓度,最高的浓度为 9.7mg/ml,之后用 0.5ml Buffer E(洗脱带两个 His 标签的蛋白)再洗四次,收集标本,测第三次的蛋白浓度为 2.4mg/ml。这是我昨天刚做的,还没有跑电泳,我想问问,用 NI-NTA 所提纯出来的蛋白的浓度有这么高吗?裂解后的蛋白浓度没有测定

很难预测,你可以别的测定浓度的方法试试,包涵体蛋白最好在变性条件下纯化,不过变性条件下载量都不会太高,1-5mg/ml 的载量都正常。

首先感谢您的热心回复,我还想问一下,我的咪唑浓度怎么样,怎样调整合理呢

先别管咪唑浓度的事,先挂上,然后用不同浓度的咪唑做阶段洗脱.详细的方法可以参考 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中的镍琼脂糖凝胶说明书,写的很详细

本来使用正常的分子筛 S-100 凝胶保存在 10mM NaOH 中一个多月后,用 0.5M NaOH 处理后很难用注射用水冲回中性,原先 22L 的柱床用 26L 注射用水就可以冲回中性的,现在用了 60L 后 PH 还是 10 以上,每次都要用缓冲液把 PH 值冲下来,现在还发现 22 升的凝胶

柱床走了 40 多升的 10mM NaOH 后出水口还检测不到有碱出来,请问老师们这是怎么回事?有什么办法让它恢复到原来的性能吗?谢谢,另:凝胶使用的次数还不到 100 次!

直接用 2M NaCl 洗柱子 5-10 个柱体积再用水或者缓冲液冲就可以,因为盐可以置换碱

请教: 25 克 DEAE sephadex A-25 用多大柱子? 我订的 1.5 乘 70 的大吗?

足够了.25 克 DEAE sephadex A-25 溶胀不到 100 毫升.其实你定 1.5 乘 40 的就可以,离子柱最好选择短粗柱,不需要装太高。

真是谢谢了!再请教一下 chromatography 兄: DEAE sephadex A-25 不知道选什么缓冲液平衡? 醋酸钠, Tris-HCl 还是 PB? 还是别的其他的缓冲液?

20-50mM Tris-HCl 就可以.pH 7-8 其实你需要根据你的目标蛋白而定

我想问一下,我现在想浓缩蛋白,我先用丙酮沉淀的,450 微升蛋白液,加 900 微升丙酮,-20 度过夜后,第二天离心收集沉淀,然后再用 50 微升 PBS 溶解,结果蛋白不能完全溶,是不是已经变性了?还有别的方法浓缩蛋白吗?我的量很少,只有 1 毫升,想把它浓缩一下,但又不能变性。

对,这样浓缩是变性,难溶解,太少样品是难浓缩,冷冻干燥也许好点

郁闷啊!快帮我看看! 1 我的穿透峰怎么是这样的?是什么原因呢?为什么会有两个峰呢?见附图! 2 如果样品的盐浓度稍高会出现填料的载量下降,会出现又穿又挂的情况吗?因为我的样品以前是全挂上的!

麻烦你说清楚你用的是什么柱子,我想如果你样品和平衡缓冲液 pH 或盐浓度不一致,就会这样

我现在分离一种分子量非常大的蛋白复合体(MW>1,000,000),选用的是 GE 的 HITRAP Q XL 强阴柱子(不选 Q HP 是因其排阻极限不能满足分子量要求,不知这样是否正确?),这里有一个问题就是我那蛋白复合体非常不稳定,离子浓度太高(文献报道 400mM NaCl 会使其解离)或 PH 变化太大将可能导致其解离,所以想请教 chromatography 在 elution buffer 选择以及其它方面能否给点意见,谢谢!

我没做过这样的实验,我觉得你只能自己去摸索.400mM NaCl 有的蛋白不一定能洗脱下,如果别的蛋白分子量小,其实最简单的还是选择凝胶柱子比较好

请教 我用 Q 柱,想浓缩发酵液中的胞外酶,问题是我现在不知道该蛋白的等电点,该如何设置上柱的 PH 值,如何上柱呢,。用 9 的 pH 值,是不是一般蛋白都能挂上去

只能试试才知道,没办法预测,你先按常规条件挂一下试试

手册已收到,THANKS!又有问题要请教你,手册中写出的 SP 的缓冲体系为, Malonate Na, Li

50 mM 5.7, Phosphate Na 50 mM 7.2, 我想要 PH6 的缓冲体系记得你告诉我用磷酸盐缓冲液就可以,可手册上写的好象还有锂离子,不知道有没有直接的磷酸盐缓冲液的配制表呢,还有手册上说,样品需要溶解在起使缓冲液中,或者更换为起使缓冲,我的为酵母的发酵的上清液,不知道可否用磷酸盐直接调节 PH 与起使缓冲一致然后就直接上柱呢?

不明白为什么加锂离子,可以不加,别的问题我想电话已经回复了,这里不多写,一些常规的问题希望大家多读读在帖子里写的那几本书.相信会有提高,而且比较系统

chromatography 兄: 再次向你请教。我用 50mM Tris pH8.0, 50mM NaCl ,1%GLY,1mM EDTA,10%甘油缓冲液进行蛋白质复性, DEAE FF 富集, 蛋白质不挂柱。去 EDTA 后, 蛋白质可以挂柱。请问怎么回事? 谢谢!

这个我想你会不会加 EDTA 后 pH 改变了呢,如果没有,那它为什么干扰吸附我也不清楚,此外 EDTA 如果没必要可以不加试试,不是每个复性缓冲液里都有吧

是不是 Q 柱只要调整 pH 值就能洗脱,不必调整盐浓度,因为我想避免将来的透析除盐

你会不会加 EDTA 后 pH 改变了呢,如果没有,那它为什么干扰吸附我也不清楚,此外 EDTA 如果没必要可以不加试试,不是每个复性缓冲液里都有吧. 已经回复了,你先检测 pH 有没有变化,如果没有,那其中原因我也不清楚。不一定,最好用盐洗脱.因为有时候 pH 接近等电点蛋白沉淀,没办法洗脱而且这样难保证蛋白活性,所以采用降低 pH 的方法洗脱蛋白不很常用,除非你蛋白用这样的方法可行。

chromatography 你好: 我最近做一蛋白的纯化, 用硫酸铵沉淀后, 蛋白没有活性, 这具体是什么原因呢? 后来用 30%乙醇沉淀, 目的蛋白有活性。可用 Tris-HCl 缓冲液溶解, 确不能溶解目的蛋白了。我应该怎么处理呢?? 多谢指点!

没活性会不会是硫酸铵干扰活性测定,你做空白对照看看,此外沉淀的时间,温度,pH 都留意,一般硫酸铵沉淀不会没活性的,你也可以用 NaCl 看能不能沉淀下来,乙醇沉淀更容易失活不溶解,自己多摸索吧

我的蛋白大约 21KD, 没有标签。先过了分子筛, 最近做了离子交换, 但是我的蛋白洗不下来。我用的胶是 DEAE-Sephadex A50,用 300mmol 的 NaCl 洗脱时, 胶的体积缩小聚集。望楼主不吝赐教!

除换填料外没什么好办法,这年代了最好选择 DEAE 琼脂糖凝胶填料,你用的填料遇盐和压力就会缩小,所以没什么好办法,你只能流速非常慢也许好点

我现在使用离子交换毛细柱(自己装的)分离蛋白混合物, 进样几次之后发现 100%的水冲洗柱子时压力增高一倍, 并且压力曲线呈现波浪式变化, 相反 100%盐溶液冲洗时压力正常并且压力曲线平稳。自己分析: 开始怀疑水相内有颗粒, 可是发现 100%水相冲洗压力才升高后盐相冲后压力又恢复正常。所以现在很困惑。请高手指教现象原因

不知道毛细柱是什么柱子,水的粘度大,压力大也很正常,降低流速会不会好点,此外你对比一

下新装的柱子是不是也这样,如果不是那说明柱子确实是有杂质才如此,用完最好彻底清洗,否则也许就会这样

我是一名刚做蛋白质纯化的新手,我的课题是纯化真核表达的奶牛 IFN- $\gamma$ ,目的蛋白大约 20KD,我取细胞上清用羟基磷灰石方法过柱进行纯化,收集所有的峰做 SDS-PAGE 和 WB,但是没有检测到目的条带。是不是我用的纯化方法不对,不知道用什么方法纯化比较好。

你的发酵液本身是不是有你目标蛋白先测定一下,确实有再纯化,此外真核表达如果浓度过低也不好纯化,还是先优化你的表达条件为好.此外你还看看有没有可能你的样品没洗下来,换别的离子柱试试,看看文献的条件

我的蛋白是 21kD,过了 ni 柱后,想脱盐,但是蛋白总共也就 5ml,量应该也不大,用什么方法方便,损失少呢,透析是否损失比较大,盐柱,我们没有监测的设备,能准确分离蛋白和盐么,超滤柱,是不是损失也比较大呢

其实我觉得除盐柱是不错的选择,回收率高,5 毫升其实你可选择 20 毫升的除盐柱子一次就可除完,不需要特殊设备,没机器可分管收集,合并蛋白部分就可,用重力的或注射器推的柱子都可以。超滤损失会大点,但是可浓缩样品,看你自己选择了

各位请教一个关于 Sephadex G100 纯化蛋白问题,老板说让我将超滤(100kd~10kd 间)后的粗酶液(细菌液体发酵)直接上柱,粗酶液我浓缩了大约 30 倍,但是只能测出总蛋白含量,目标蛋白含量不清楚,而目标蛋白的分子量大约在 25~55kd 之间,因此,考虑到样品中所含杂蛋白可能比较多,所以我用了 1.6\*100 的柱子,柱材是 Sephadex G100,流速 0.5ml/min 可是上了样跑了 20 小时发现什么也没有,会是什么原因呢?样品扩散了,还是浓度不够?又或者是别的什么原因?应该怎么办?刚才忘记问了 1.6\*100 的柱子,柱材 Sephadex G100,流速 0.5ml/min,样品中目标蛋白的浓度大约要达到多少才能被检测出来呢?

最好先用离子交换粗分,或者疏水也可以试试,这样可以处理大体积样品,又粗步分离,再用凝胶柱子的好,而你现在这样做你的柱子最多也就上 10 毫升左右的样品,如果浓度不高,肯定电泳跑不出来.而目标蛋白含量低很难检测,所以你如果可能的话是建立活性测定方法这样保险点.电泳浓度最好需要 1mg/ml 左右.,而检测器不一定,看机器设定了,我想也需要差不多 0.5mg/ml 吧

chromatography 兄: 我用 50mM Tris pH8.0, 50mM NaCl, 1%GLY, 10%甘油缓冲液进行蛋白质复性, DEAE FF 富集, XK16 柱, 10ml 填料。新胶, 上周用过几次, 周二再次使用发现结合量明显减少, 用 0.5M NaOH, 70%乙醇分别清洗, 没有改善。重装柱, 发现填料呈柳絮状, 但能沉积。请问怎么回事?

用 6 M 盐酸胍加 1 %吐温洗 5 个柱体积试试, 应该是有东西沉淀在柱子上。

chromatography 兄台: 我是新来纯化的, 有个比较基础的问题: 我们现在用大的 DE52 和 ProteinA 柱子做抗体纯化, 装填料 140ml 左右, 这洗脱液的流速怎么控制? 快了怕洗不好, 慢了又太耽误时间。有没有比较经验的确定流速的方法? 有老先生告诉我可以加 10 倍于填料量的缓冲液后的自然流出速度为佳, 可大柱子怎么加到 10 倍呀? 如果方便我还有一个问

题：洗脱杂蛋白和抗体的洗脱时间怎么确定，我们总怕洗不干净影响了以后的纯化。

通常采用平衡洗脱 2 — 5 毫升 / 分钟，上样 1 — 2 毫升 / 分钟就可以，不过还是看样品而定。这么大的柱子最好有泵控制流速。洗抗体后最好再生一下，具体的操作 看说明书，如果不很清楚也可以参考别的公司的同类说明书。[www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中有,此外最好有技术的问题直接问厂家,毕竟自己的产品自己更熟悉

请教 chromatography 兄：我用亲和色谱柱纯化淀粉酶，用文献上的方法制备的亲和胶，粗酶液中我能测出淀粉酶的活性，但是过柱后监测不到淀粉酶，只有杂蛋白，这是什么原因？

应该已经挂上酶了,那你洗脱挂在填料上的酶就可以了

chromatography 兄：大概一个月前我向你请教过腹水单抗纯化的问题，当时的结果非常奇怪，后来才知道我把老板的抗体当作腹水上样了，流穿液跑出来的一条带是 BSA，罪过罪过！最近用真正的腹水上样了，还是以前的条件：HiTrap Protein A HP 1ml 的亲和层析柱，平衡 buffer 是 0.1M pH8.0 PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)，洗脱 buffer 是 0.1M 柠檬酸溶液，不过经你上次的建议改变了 pH(由以前的 6.5 降至 3.0)，中和 buffer 是 1M pH 9.0 Tris-HCL。这一次洗脱液里有抗体，但是浓度很低，反而流穿液和洗杂液里浓度高的多，很是纳闷！是不是挂柱不好？我从汪家政的《蛋白质技术手册》里 看到一个“不同种属免疫球蛋白与蛋白 A 或 G 的结合强度”列表，上面说小鼠 IgG1 与蛋白 A 结合弱，而与蛋白 G 结合强。我看过几篇关于纯化单抗的文章，有用蛋白 A，也有用蛋白 G 的。另外在制备单抗的过程中事先并不知道其亚类，都是纯化之后再鉴定的，那么这个配体的选择应该不会这么受限吧。我听卖层析柱给我的人说应该不是这个问题，很有可能是 buffer 的事。你上次建议“可以在平衡缓冲液中加盐到 2M 有利 IgG1 吸附”，你所说的盐是指 NaCl 吗？是否可以用通常所说的 pH7.4 PBS (137mM NaCl, 2.7 mM KCl,10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 作平衡 buffer 呢？现在把透析浓缩之后仅剩的一点洗脱液还有流穿液和洗杂液都放在 4 度冰箱里，不知道下一步该怎么办，这次要是再搞砸了真不知道怎么跟老板交待，还请 chromatography 兄给予进一步的指导！

通常增加盐浓度可以提高抗体与蛋白 a 的结合力，此外可以把 pH 调到 8.5，这样吸附会比你普通的 pH7.4 PBS (137mM NaCl, 2.7 mM KCl,10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 好，. 你可以把这里的盐浓度增加到 2 M,pH 调到 8.5 即可.穿透的样品可以调盐浓度和 PH 和缓冲液一样继续过柱子就可以

Ni-IDA 在 elute buffer 洗脱样品之后，用 binding buffer 洗柱准备再用，结果发现胶的颜色越来越淡，应该是 Ni 被洗脱下来，而且胶凝在一起，无法吹打，请问 chromatography 兄，可能的原因是什么？以后该怎样回收 Ni 胶

那就再生,重新螯合即可,可参考[www.wsac.cn](http://www.wsac.cn)的资料下载中镍琼脂糖凝胶的说明书,都差不多通用.胶凝在一起也许是你柱子上杂质太多,需要彻底再生才好

chromatography ,你好,我在坛子里有幸看过了你关于 Q HP 柱的再生方法,我用的是 SP 柱.因在冰箱放置时出了点问题，柱子现在过蛋白都不结合,老板让我先把柱子再生后再用,我想请教一下 SP SEPHAROSE HP 的再生方法,不胜感激

不知道你的的是怎么样的柱子 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中有常规填料的再生的方法,你可以参考,也可以看说明书.此外也留意你样品的 pH 及盐浓度

chromatography 兄,你好!我有个蛋白尾端是半胱氨酸,要用交联剂通过 SH 键交联到固相上.请问用什么交联剂和什么 bead.交联剂是怎么先固定在 bead 上,然后能交联蛋白呢?

很简单,选择活化巯基琼脂糖凝胶在常温中性条件下可以很容易形成二硫键偶连到琼脂糖凝胶上,具体的方法可参考 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中的的活化巯基琼脂糖凝胶 FF 说明书.也可以选择环氧活化琼脂糖凝胶也可以

chromatography 老师,正好您也在线,又来找您帮忙了!上次您说:最好先用离子交换粗分,或者疏水也可以试试,这样可以处理大体积样品,又粗步分离,再用凝胶柱子的好,而你现在这样做你的柱子最多也就上 10 毫升左右的样品,如果浓度不高,肯定电泳跑不出来.而目标蛋白含量低很难检测,所以你如果可能的话是建立活性测定方法这样保险点.跑电泳浓度最好需要 1mg/ml 左右.,而检测器不一定,看机器设定了,我想也需要差不多 0.5mg/ml 吧.可是现在我们手头上没有离子交换和疏水的柱材,另外对这种蛋白的性质了解的也不够全面,所以做这两种层析恐怕不现实.上周我又把样品用聚乙二醇 20000 浓缩了一下,发现样品变得很粘,根本无法跑柱子.还有其他的办法可以对样品进行预处理么?现在我开始怀疑我的柱材或是检测仪器有问题了,我想问一下,对于分子量在 25~55kd 之间的蛋白,1.6\*100 的柱子,柱材 Sephadex G100,流速 0.5ml/min,大约会几个小时或者多大的洗脱体积会出样品?我用 20mg/ml 的牛血清白蛋白组分五过柱,想试看看究竟多少小时能出样品,结果现在已经上样后 20 小时过去了,洗脱体积也已经达到 600 ml (3 倍柱床体积了),还是没有峰出现,请问是什么原因?是我等的时间不够长么?

按你说我觉得也许你的检测器或者记录仪设定有问题,你仔细检查一下,你可以直接取蛋白溶液过检测器,没信号说明没设定对

你好,我对蛋白质的纯化不太清楚,想请问你一个比较基础的问题:我有一个质粒,上面没有带标签.现在我将它转到 HEK293 细胞里面做成了稳定转染的细胞株,western 检测该蛋白在细胞和培养基中的表达水平都很高,我现在想得到纯化的该蛋白,请问有方法直接从培养基中得到吗?我需要的纯度不需要太高,因为我只是想拿纯化的该蛋白做为一种蛋白酶的底物,检测蛋白酶的活性,有什么方法可以比较方便的将培养基中的蛋白纯化?我的蛋白的分子量大约是 550KD

离子交换是最常规的方法,你先试试吧

请教 2 个问题: 1、离心管式的超滤器如何重复使用? 2、5ml 脱盐柱的具体使用方法?

1.最好是问厂家,通常用后碱洗,不同产品也许有差别,所以问厂家最保险. 2.通常都是平衡 3-5 个柱体积,上样,用缓冲液冲洗和普通的凝胶柱子一样的用法

我想请教交联剂是怎样联到琼脂糖凝胶上的,因为琼脂糖凝胶显然是没有二硫键的

琼脂糖凝胶经过活化,然后引入巯基,再用二硫联吡啶等去活化巯基,这样填料遇到带巯基的物质就会很容易形成二硫键被偶连,可以参考一些蛋白纯化书中的共价 色谱,如化工出版社出的陆健等编著<蛋白质纯化技术及应用>中的 147 页.可以用这样的活化巯基的填料偶连及纯化带巯基的物质

目的蛋白纯化柱子之前浓度为 0.2mg/ml, 体积 50ml,过 2ml 体积的 NI 柱, 整个玻璃柱只能装 10ml 总体积样品。。。请问, 过柱之前是否需要浓缩蛋白溶液, 如何浓缩, 纯化后的蛋白溶液将用于 ELISA 反应, 如何保存蛋白比较合适, 请楼主帮忙解决一下

不需要浓缩样品,保持看你蛋白的稳定性了,通常-20 度冷冻即可,但是纯化后的样品最好除去咪唑再冷冻保存

两种蛋白的混合液, 等电点分别为 10.8 和 8.5, 现在要用 CM-sepharose FF 胶将两者分离, 现可以选用 pH 为 4.0, 4.5, 5.0 和 5.5, 浓度为 0.05mol/l 醋酸缓冲液来平衡上样, 同样可以选用 pH 为 4.0, 4.5, 5.0 和 5.5, 浓度为 0.2mol/l 醋酸缓冲液来洗脱, 理论上用那种体系 (pH 为多少) 好些。为什么?

最好把 pH 调到 8-9 试试,这样 8.5 直接穿透,而 10.8 可能挂上,洗脱最好是缓冲液加盐,通常不采用降低 pH 方法洗脱.上样当然用低浓度的缓冲液好,但是 pH 别太低,会影响活性

想问下楼主, 我提取的是一种酶蛋白, 用 deae sephadex a-25 上样后没有洗脱下来, 用了 0-1Mol 梯度, 最后用 2 Mol 还是不行, 实在不知道该怎么办了, 请楼主能给点建议, 非常感谢 !

怀疑蛋白变性或者蛋白能和填料结合,查查文献.不知道你怎么知道没洗脱下来,此外留意洗脱的溶液会不会干扰活性测定

chromatography 兄, 我按照彻底再生镍胶的方法进行再生, 但是在加 2 倍体积 SDS 时, 由于实验室温度较低, SDS 加入之后开始凝结, 我又转移到 30 度烘箱内过柱, 可柱子还是象被堵住了, 柱内液体无法滴下, 请问这种情况该如何处理

没遇到过,实在不行就把填料取出来重装,SDS 在碱性条件下能很好溶解,你也可以用 0.5M NaOH 处理试试

因为我对于蛋白质的纯化属于入门阶段,我想问你对离子交换有比较成熟的方法吗?或者有更好的 protocol 能发给我一份吗?

,基础的知识蛋白纯化的书写的比较系统, ,你也可在帖子中搜索一下,说过不少次这些书了 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载下有填料选择指南和生物大分子分离纯化策略,希望有帮助

色谱老师:

又来麻烦你了! 我的蛋白 2KD,等电点是 8.35, 复性之后, 我想除去 DTT,和 GSSG,请您帮我设计下一步纯化方案

选择 G10 这类的凝胶柱子, 蛋白 2KD 走外水, 而 DTT,和 GSSG 走内水体积, 和除盐一样, 可以选择葡聚糖凝胶 G 15

色谱兄: 我纯化的蛋白里现在已经比较纯了, 主要是 7kD 的小分子, 但含有一条很浅的约 11kD 的带, 我怎样将它除去呢? 请您帮帮我

不知道你原来用的什么柱子,你可以选择离子交换填料,也可以选择凝胶柱试试,但是最好选择颗粒小的高分辨率的填料

我用的是 HiTrap sp HP 5ml 的预装柱,我想再生一下,有人说 Q 柱和 S P 柱的再生方法是一样的,不知道是不是? 柱子是以前老板刚回国的时候购买的,放置在冰箱已经快 7 年了,最近拿来用时,发现 Q 柱和 SP 柱都不和我的蛋白结合,我在坛子上看了你有关 HiTrap Q HP 的再生方法 0.5MNaOH 加 2MNaCl 2-5 个体积,水 2-5 个体积,用缓冲液平衡 3-5 个体积,start buffer 和 elution buffer 的 PH 值都调至 8.0, 按照上述处理后,能够洗出峰,结果跑电泳一看,目的蛋白在加 elution buffer 以前已经洗出来了,而且非常不可理解的是,峰值地方没有任何蛋白条带,我很期望能得到你的指点,希望能给些建议

对,离子柱再生都差不多。峰地方没蛋白也许是盐过高,跑电泳的问题,或者是有核酸,你用 280 扫一下看看,此外留意你样品的盐浓度和 pH,尽量和平衡缓冲液一致,如果有条件换阴柱试试

chromatography, 你好! 现在我在做 HBsAg 的酵母表达。目前已获得带 histag 的重组表达菌株。用 ni 柱纯化,发现不能很好的挂住,流穿液中有大量目标蛋白,采取变性条件下纯化也是如此。估计是蛋白组装成颗粒导致 his 包埋了。我现在打算采用疏水纯化,最后的产品是用作检测试剂原料,所以不需要特别纯,你能给我一些建议吗? 还有你们的产品广州怎么联系啊? 谢谢

蛋白颗粒太大,所以位阻不小,变性也许不彻底,你加点 DTT,此外选择盐酸胍应该能改善,我们有一种手臂长的镍柱子,也许能好点,疏水也不错,通常都选择丁基琼脂糖,www.wsac.cn 资料下载中有产品目录

chromatography, 你好! 谢谢你的回复。我采用的是 8M 胍的变性条件,盐酸胍能改善吗? 我先试一下,以后还请你多多帮助!

盐酸胍能改善,因为它能把尿素打不开的结构打开,使标签暴露更好

你好.请问你在 GST 融合蛋白纯化过程中,有没有遇到过 GST 融合蛋白 GST 自己脱落的现象? 我现在在攻一个激酶(74kd),GST 融合全长蛋白 104kd 左右。在上清中都能看到全长的 104kd 蛋白,过完 5mL 的 GST-FF Trap 柱之后,104kd 条带在透出液中消失,但是同时 74kd 的条带开始增多,并且在洗杂过程中也有存在.通过活性纯化表格发现,90%的活性在 FT 和洗杂中损失.得率不到 10%。得到的 Elution 是二个片段,74kd 与 30kd 左右的 GST,Western-Blot anti GST 不能将 74kd 左右的蛋白爆出来.说明的确是 GST 脱落.但蛋白是否脱落完 GST 后自身又降解,我就不敢下结论了。我另外两个 GST 融合激酶(106kd,和 96kd)也出现了同样的情况。我用过 PBS,用过 50mMTris,加 1% Triton ,或者加 1% Tween,加或不加 1mM PMSF 都一样.5mL

的柱子或者 1mL 的 GST-resin 都改变不了我的纯化结果.都是 74kd 与 30kd.另外有一点,我的 Buffer 都有 50mM 或者 200mM 到 500mM 的 NaCl,因为非特异性的杂带特别多,如果不加盐的话,的确就能够看到 104kd,74kd 还有 30kd 的蛋白条带.但是 104kd 的片段也是非常非常少.蛋白特别杂。我现在快疯了.两个月都拿不到融合蛋白.而不确定我的 74kd 片段是什么东西.我想问:盐和 GST 融合蛋白相冲突嘛?是不是大分子量的 GST 融合蛋白容易脱落(我的 Buffer 中有 0.27M 蔗糖,做为保护剂).克兄有什么好的建议嘛??

没做过你这样的酶,但是就你说的情况而言,真是少见降解这么快的,激酶活性需要一些辅助因子,如金属离子和辅酶等,所以你在样品中加点 EDTA 也许能抑制,此外可以在低温条件下纯化,我倒觉得有没有可能你的蛋白没洗下来,洗脱不彻底,你可以取填料直接和样品混合,然后清洗,直接用填料跑电泳看看填料上有没有你的目标蛋白去证明

有什么办法能够提高 GST 柱的亲和能力嘛?我另外还有一个 69kd 的 GST 融合蛋白,每次 FT 都很多(5mL 的 GST 柱重复上样 3 次,1mL 的 resin 也一样).透出液都和上清没什么区别.另外一条特异性的杂带倒是看着富集了不少..郁闷的

我觉得最好要注意一下样品的处理,破碎温和,时间别太长,破碎后马上纯化,因为如果 GST 部分没活性是挂不上的,样品和平衡缓冲液中加 1-2mM DTT 可以提高作用力,还有只看穿透不一定能证明没挂上,因为有时候柱子很少吸附不了多少蛋白,注意以上问题,希望能挂上.1%的 Triton 是不是会影响 GST 和 GST 柱的结合?我看其它人都用 PBS+0.1%的 Triton

应该影响不大。你可对比一下试试。

求助：你好！我是从细菌中提取一种酶，目前已基本知道应该是存在于发酵液中。通过 PEG8000 直接浓缩发酵液酶活有增加。但是通过盐析，饱和度已接近 100%沉淀中仍然检测不到目的蛋白，搞不明白是怎么回事。这个酶的具体特性也并不知道，目前只知道发酵液与 pH6 缓冲液配的底物反应可以测到活性。

那你测定蛋白的上清看有没有活性，硫酸铵会不会干扰活性测定，你做空白对照看看，还有沉淀留意温度和时间，别失活

我用的葡聚糖 G150 的柱子，自己装的，用了一段时间之后，形成了黑色斑点，请问是不是长菌了？怎么处理？请问容涨好了的胶还可以再次煮吗？

应该是，可以再次煮，然后沉淀把上面沉淀慢的吸去，反复几次就可以，不用最好要用叠氮钠保护葡聚糖凝胶，而现在新的填料都可以保存在 20-25%的乙醇中

大哥再问你个问题，我用丙酮沉淀我的酵母培养（离心）上清液后，发现管底有一层比较粘又油的东西，白色的蛋白浮在这层上面。不知道是什么东西，如何去除掉。不去除的话好象没办法跑电泳

也许是多糖或者核酸等，不很清楚，你直接取点白色蛋白跑电泳就可以了。我也不知道怎么去：）其实沉淀不会很好溶解的。你可以想办法提取白色的部分即可，你也可以用乙醇沉淀试试，毕竟丙酮沉淀做不好蛋白会失活，如果只跑电泳那倒没关系

chromatography 兄：我在做一个蛋白，在中性缓冲液中容易形成沉淀，进入 DTT 后沉淀可以很好的溶解，但几个小时后又会重新沉淀。我想是蛋白的巯基在 DTT 作用后打开，而后又在空气中被氧化。看到资料上说在做双向电泳时常常加入烷化剂如碘乙酰胺 来封闭打开的巯基，我想问问具体的试验操作怎么做，加入碘乙酰胺 的浓度应该是多少，反应的温度和时间如何？过量的碘乙酰胺能否通过透析或 G25 柱除去？

抱歉,具体操作你看看有关双向电泳的书或文献,我没做过,就原理而言就是在 pH8 左右,碘代物质就能和巯基反应,温度室温,时间一小时左右.浓度我想 10mM 足够,样品可直接跑电泳不试试, 如果有干扰可过柱子和透析除去

chromatography 兄：你好！我有两个蛋白都是 60 多 kD，两者只是相差 1 个氨基酸，用什么方法分开它们呢？HPLC 可以么（蛋白会不会有些大）？

估计难,只能试试,也许高效毛细管电泳更好点

那么反相 hplc 可以么？

可以试试,但是不一定能分开

谢谢 chromatography 再就是我柱子处理的时候黑色颗粒不再上层，而是均匀分布，问一下又没有好的办法把黑色东西除掉？

就按我说的做就差不多可以,直接洗是洗不掉的,只能把填料取出来处理

您在一次回帖中这样写到：这个我们以前的实验室做得比较多，他们大多用凝胶过滤，我觉得这也不错的做法，毕竟 PEG 是链状的分子，在柱子上和普通蛋白行为不一样，修饰度越高那么出峰也越后，因此你的蛋白选择 sephadex G50 试试，它的范围在 1000-30000，应该是不错的选择。我想问一下：同大小分子量的蛋白，在相同可分级分离的凝胶介质中，条件相同时，链状蛋白和球形蛋白哪个先出来？记得我在《重组蛋白纯化技术》一书中看到，因为球形蛋白较纤维状蛋白更容易进入凝胶内部，所以球形蛋白较晚流出。（这里说得纤维状蛋白应该是链状蛋白吧！）

其实很难判断蛋白的形状,就相同分子量范围的蛋白而言,在天然状态下是球型,变性条件下是松散型的,可是松散状态下其实流经柱子的路径和球型是不一样的,对于都在凝胶分离范围而言,还是松散型路径长,因为好些地方容易阻挡,而球型阻力会小,同样都在外水体积也差不多这样的道理,所以我觉得线状分子能进入很多球状分子进不去的小孔,所以后出,不过只是想象,你想证明这个问题简单的方法是找个蛋白在天然和变性条件下看出峰时间的先后就可以证明.对 PEG 修饰蛋白而言,是因为结构更松散,情况更复杂,你查查文献看在凝胶柱子上修饰和没修饰的对比也可以知道到底谁先出

色谱兄：我之前纯化的蛋白用的是 sephedax G-75 和 DE 52 填料，我纯化的蛋白里现在已经比较纯了，主要是 8kD 的小分子(约占 80%)，但含有一条很浅的约 13kD 的带(约占 20%)，我该怎样将它除去呢？通过 sephedax G-75 过滤分离效果不怎么好，我用的是中粗的填料，

超细的和中粗的填料分辨率能有多大差异，流速的影响大么？分子量比较小的蛋白 9~13kD 的有什么比较好的方法能分开？

这么近的分子量我觉得很难说,有高分辨率的预装凝胶柱子可以试试,如果没有就换高分辨率的离子柱,也可以用疏水试试,很难预测的.凝胶填料超细肯定分离效果高,但是你的最好选 G50 好点.流速也不能太慢,通常效果应该比快的好

请教一个问题：我用 EDTA 灭活金属蛋白酶的活性，EDTA 浓度 0.01M，对生理盐水透析 24 小时，结果透析袋内样品出现了小片状沉淀物，可能是什么原因呢。另外，去除金属蛋白酶金属离子的方法还有哪些呢（保留其可能的其它活性），请不吝指教！

去掉金属离子如果活性必须的话应该难保证活性,金属蛋白酶种类不少,我没接触过,你最好是查文献,当然如果透析后没活性你就达到目的了,适当降低浓度试试

还有一个问题，用密理博的一次性针滤过滤蛋白，结果同一注射器滤出的液体，3 管有一管测不到蛋白，是不是被吸附在滤膜上呢，跟蛋白的理化性质有关吗？

有可能,注意样品是不是浑浊,如果不是那应该被吸附.应该和蛋白本身有关

chromatography:您好，想请教您一个问题，我打算将一个带有—COOH 的分子量为 516 的化学小分子连接到 Sepharose 4B 柱材（带有—NH<sub>2</sub>）上，根据柱材的说明书，反应应该先用甲醇溶解化学小分子配基，再通过 EDC 催化配基与柱材发生缩合反应，但我的配基在甲醇溶液中几乎不溶，我可以换换反应体系的溶剂吗，比如：先用 DMSO 溶解配基，再加甲醇，这样会影响连接柱材吗？

可以直接在水中偶连即可,你可以稍微取点样品试试看怎么样的溶液中能溶解,此外偶连需要在偏酸性的条件.填料在这些你说的溶剂中都没问题

我又遇见奇怪的现象了！我将发酵后的菌液超滤浓缩，取 50kd~10kd 部分（棕褐色液体），上柱，1.6\*100 的柱子，柱材 Sephadex G100，流速 0.5ml/min，我跑蓝色葡聚糖 2000 用了大约 9 小时才有峰出来，而我跑我的样品，竟然 5 小时左右就有有颜色的物质出来了，这是怎么回事呢？理论上不是应当大分子出来的快，小分子出来的慢么，而我的样品中应当不含有大分子物质啊？

蓝色葡聚糖 2000 是个线性分子和蛋白是不一样的,何况有颜色的不一定是小分子,此外也许蓝色葡聚糖 2000 有些吸附,所以慢,跑这么久真是不容易.因此别在意这个,我怀疑蓝色葡聚糖 2000 跑的不正常

我是个新手，想请教一下，CNBr-activated Sepharose 4B 的 binding buffer 如何配制的，说明书里面没有，谢谢

简单,不过我觉得应该是偶联缓冲液。0.1M 碳酸氢钠溶液即可 pH8.3 左右，可以参考 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中 CNBr 活化琼脂糖凝胶的说明书

色谱兄，我想用一次性注射器改装一个小柱子，请问底部用什么材料可以挡住凝胶。有人说用脱脂棉就行，那样对纯化有什么影响吗？

用棉花可以,对纯化不会有什么影响的,只要不漏填料就可以

色谱老师：我现在有个样品分子量 20~45kD，我用的是 sephadex G 75,理论上应该能分开的，可是我跑了四次都是一个峰下来，柱子是 1.6\*50cm，1.6\*70cm 的两种都试过，流速 0.5ml/min,0.3ml /min 都试过，可是没什么改善，还是一个峰或者是严重重叠，我不知道是怎么回事，是不是填料有问题？

很正常,sephadex G 75,分辨率并不高,而且也不是所有有差别的蛋白分子就能分开,建议你还是换高分辨率的填料或者离子及别的分离机制的填料,此外看你有电泳几条带,最理想的是想办法使一些能在内水体积,一些在外水体积,这样凝胶分离效果更好,多试试吧.

色谱老师：谢谢您，我的蛋白有四条带，您说的高分辨率的填料是指什么呢，20 多 kD 到 40 多 kD 的之间好像很难找到一些能在内水体积，一些在外水体积的填料。主要是导师经费有限，可试的填料太少了，给点建议可以么

就是 HP 系列,34 微米左右的填料,如果没经费那也没办法,不多试试仅靠手中的柱子难完成你的纯化工作

chromatography, 我要从细胞中提取一个蛋白复合物，该蛋白复合物含量不是很高，纯化的过程中要用到 ConA 琼脂糖柱、ADP 琼脂糖柱，听说这些柱子最好用具有蠕动泵的蛋白层析系统，可是我们这里条件有限，我能否用类似于镍离子柱的方法进行手工操作呢？

可以用手工操作,但是如果你的样品体积很大,那最好需要用泵上样,或者你先用超滤等方法浓缩样品,再跑亲和

chromatography 老师:我现在做疏水层析的时候，在同一个梯度出现两个蛋白峰是怎么回事啊？做了三次都是这样，柱子重新装过后还是这样。用的填料是：Phenyl Sepharose High Performance，样品是(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀后上清样品，上样前用平衡缓冲液（20 mM Tris-Cl，2M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，pH 8.5）平衡，洗脱时设置两个梯度，I：20 mM Tris-Cl，1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和 II：（20 mM Tris-Cl，0.5M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，在第一个梯度出现两个蛋白峰如图所示：对了，我们在还没有买填料之前，是在另外一个实验室做的，当时没有出现一个梯度两个峰这种情况。

这也没什么,说明刚换梯度就有东西下来了,到底下又有物质出来,你跑电泳看这两东西是不是一样就知道了.还是以电泳检测为准

同一个梯度出现两个峰，我做蛋白电泳不一样，我要的目的蛋白在第二个峰里面，本来在一个梯度出现的第二个峰是应该出现在下一个梯度当中的，现在是我要的目的蛋白在第二和第三个峰中！怎么改进啊？

仔细看图好象电导曲线显示不是两梯度,而是有四个,所以才会出现四个峰,我觉得你会不会

你的柱子上面有死体积造成这样变化,所以没死体积,你只会有两个变化点,但是现在有四个,所以你还是检查一下柱子,别让柱子上面有水,要转换头直接挨着填料.此外在做溶液转换的时候,最好要先用这个液体去洗一下管道,避免和别的液体混合导致浓度变化

抗血清脱色用什么柱子好呢。谢谢!有时抗体不需要太高的纯度,就是想把颜色去掉,脱色的同时最好保证一下抗体的收率。硫酸铵沉淀的话,处理量比较大,我也没有大容量的离心机,而且还得透析除盐。所以的最好有一个柱子,只吸附色素,抗体等蛋白放行,这样想想比较简便,也便于大量处理。您是树脂的行家,帮忙参考参考,也恳请其他战友出谋划策。抗血清中呈色物质应该是血色素,抗体主要是 IgG, 150kd 左右,供参考

如果你确定色素是小分子可以透析,过除盐柱,或者直接用低温乙醇沉淀即可,大规模纯化抗体就用的是低温乙醇沉淀.你都可以试试

我做的也是关于蛋白纯化方面的课题,纯化的是一个由十三个氨基酸组成小肽,串联成六拷贝和十二拷贝表达,用的是带有 his 标签的 pET-32c(+)载体,如果我想大量纯化得到大量纯品,请问用哪种方法比较合适?还是用哪种纯化柱更好一些?

带标签最好是选择镍琼脂糖凝胶或镍 NTA 琼脂糖凝胶去纯化,没好的方法,可以参考 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中镍琼脂糖凝胶的说明书,也包括了镍 NTA 琼脂糖凝胶说明书,此外说明书也通用于进口的同类填料

我从猪肾里纯化一种酶,经硫酸铵沉淀等步骤后,过 G25 脱盐,过 DEAE 后,上 PG75,可是 280nm 监测是一条直线??? 上样的蛋白约 1mg/ml, 上样体积 2ml, 缓冲液为 pH8.0 的 Tris 50mmol/L, 柱子为 XK16/70, 柱体积 120ml, 流速 0.6ml/min。有人说是蛋白量太低了,我是用 5KD 的超速离心杯浓缩的,再怎么浓缩呢?请帮忙,多谢!//还请问样品需要过 0.45um 的膜吗?怎么虑过呢?

应该不算高,你不熟悉最好问周围用机器的人,他回告诉你怎么设机器的灵敏度,这样就不是直线,怀疑你记录仪或者检测器没设定好,浓缩也一样问周围的人,毕竟那样更直接,或者问卖给你产品的厂家,样品最好过滤,有一次性滤器.常规操作最好是问周围熟悉的人,这样更清楚点

chromatography 老师:又要来麻烦你了,还是关于离子交换柱的问题,我纯化的蛋白是通过原核表达的蛋白,该蛋白主要溶于 1%SDS 中,原来采用的是想通过亲和层析纯化蛋白,没有挂柱,我曾经请教过你这个问题,当时你建议我是通过变性再过柱,不过我的蛋白是已可溶的形式存在的,纯化后的蛋白要做下一步的功能和结构的研究,所以我要拿到有活性的蛋白做下一步三维结构方面的工作的,因此不能进行变性处理,现在我改用了离子交换得方式,由于我的蛋白主要是溶于 1%SDS 中,因此老板建议我配制 start buffer 和 elution buffer 必须要加入 1%SDS 才行,否则可能会过柱时会沉淀,我的配制为 start buffer (20mM Tris-HCl + 1%SDS PH 8.8) elution buffer (20mM Tris- HCl + 1M NaCl + 1%SDS)可问题来了 start buffer 一切正常, elution buffer 的 SDS 很难溶,只有加热才能溶,但过柱时又马上沉淀,应该是遇冷沉淀了)把柱子堵的一塌糊涂,后来考虑是盐浓度高了,把盐浓度调到 0.5M 还是不行,把 SDS 浓度调到 0.5%也不行,现在真是穷途末路了,不知道该怎么做下一步了,希望能得到你的建议

我觉得你最好是别用 SDS,因为这样离子柱上是挂不上的,蛋白会结合 SDS,这样很难纯化,我没配过你这样的溶液,蛋白都结合 SDS,电荷差异性没有了,所以难分离,不做也罢,你可以换个配基密度更高的镍柱去做也许能挂上,这样的例子也是有的,不换填料也没办法

chromatography 兄: 我做 chelating FF 柱上蛋白复性, 变性液含 5mM DTT, 上样后发现穿出变黄, 用 0.5M 咪唑洗脱, 0.1M EDTA 脱 Ni, 发现填料变黄。变性液含 5mM DTT 直接加 0.1M Ni 发生反应, 立即变黄。我怎么挽救填料啊?

这个填料耐受不了这么高的还原剂,再生填料,重新螯合,如果稍微有点黄没关系的.你也可以直接用 5mM DTT 溶液洗柱子,先柱子变黄,后黑,最后变白重新螯合即可

我打算把样品浓缩后进行手工操作, 那您看我用多大规格的柱子比较合适呢?

关键看你需要的蛋白量, 10-100mg 通常手工操作的柱子也就 5-10 毫升就差不多了

还有一问, 我的蛋白具有 ATP 酶活性, 和 ATP 及 ADP 都具有亲和力, 所以我的蛋白纯化中还会用到 ADP 琼脂糖凝胶, 但是供货商总是问我要用 2',5'-ADP 琼脂糖还是 3',5'-ADP 琼脂糖, 我看的文献中只说用 ADP 琼脂糖凝胶纯化, 并没有说明是哪一种, 您看, 我应该选择哪种比较合适呢?

如果只对母核有亲和的理论上这两应该都可以, 何况你的对 ATP 及 ADP 都具有亲和力, 那说明对磷酸苷部分要求不高, 所以我觉得都可以

请问我们的包涵体在 6M UREA 中处于变性状态, 现在由于没时间做复性, 想暂时在 -80 度冰箱保存, 可以吗, 对蛋白活性有没有影响?

没问题.通常变性条件下是没活性的,所以不用担心

我是新手, 最近在做一个 6-HIS 的蛋白纯化, PET28 (a) 原核表达. HIS 前融合. SDS-PAGE 电泳显示诱导前后有差别, 条带位置与理论计算分子量大小差不多. Western-blot 用 HIS 单抗杂交也能杂出来, 位置也对. 但是做 NI 亲和层析时, 穿出液与上样没有差别, 估计是不挂柱. 我认为是 6-HIS 在空间构象中没有暴露或者暴露不完全, 后来我在上样品中加入了 6M, 8M 的尿素, 再做 NI 亲和, 洗脱液中仍然没有目的蛋白. 我用的是咪唑梯度洗脱. chromatography 兄给一些建设性的意见吧, 课题做不下去了, 用了老板很多米, 没法交代了

怎么会呢,挂不上的情况是有,但是变性条件下挂不上很少见,你用的是什么填料呢,换一个也许能挂上,此外不能仅靠穿透和原来样品差不多就证明没挂上,你洗脱和平衡的缓冲液中也需要有 6M 盐酸胍或 8M 的尿素,样品最好是用 6M 盐酸胍变性更好.可以参考 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 中的资料下载中的说明书

我洗脱和平衡的缓冲液中没有加 6M 盐酸胍或 8M 的尿素. 不知道这个是不是主要原因? 后面还有很多事情要做, 我想把纯化的工作交给公司去做, 不知道 chromatography 兄可不可

以帮这个忙？具体事宜可以进一步谈的

这是主要原因,当然需要洗脱及平衡溶液要和样品的一致,其实这个纯化很简单,自己做就可以.纯化这样的蛋白不是什么难事

chromatography 老师:你好,这两天按照你的建议实验了一下,我的蛋白样品是一直都保存 10mM 的 PBS 缓冲液+1%SDS 里面,start buffer 和 elution buffer 都没有加 SDS start buffer(20mM Tris-Hcl PH:8.8) elution buffer(20mM Tris-Hcl +1M NaCl PH:8.8),蛋白样品取 (5ml 加 10ml 20mM Tris-Hcl PH 7.4)按流程操作过 Q 柱 图表上可以看到两个峰,第一个是上样峰,第二个洗脱的峰,总算比以前进了一步,以前是一直都不和柱子结合,还是挺开心的,结果把收集的各管跑 SDS-PAGE 电泳,发现是杂蛋白部分洗了下来,我的目的蛋白没有洗下来,我现在考虑两个方法,一是先加盐浓度洗,看能不能洗的下来,二是用不含盐的 1%SDS 洗(考虑是不是因为没有加 SDS 导致蛋白沉淀在柱子里面),加盐的 SDS 实在是过不了柱,真诚地想你给我点建议,为了过柱这个蛋白,我是伤透了脑筋,本来是以为穷途末路,上次按你的建议好象有点进展了,还是希望能得到你的指点,非常感谢

平衡和洗脱缓冲液 p H 降低到 7.4 试试,此外洗脱的盐浓度可以更高到 2 M,你也可以走线性梯度.降低 pH 有利于洗脱。

在镍柱纯化过程中,Tris 和磷酸盐缓冲液有什么区别嘛?

低浓度如 20-50mM 没什么区别,一样,不过这也要看蛋白,最好是选择磷酸盐缓冲液

我的一个激酶, His-Tagx6 的,好象非常奇怪,这个蛋白竟然挂在 Ni 柱上下不来,用 Ni-NTA 也是,都是趴在填料上,1M 咪唑只能冲下来极少极少的蛋白.2M 咪唑(pH9.2)也冲不下,用含 50mMEDTA 50mMTris 7.2 0.5M NaCl 冲,镍离子颜色全部退掉之后,蛋白竟然还是不下来.好象只能用 NaOH 才能冲下来,但 NaOH 冲下来的蛋白质又不能用 SDS 跑胶.

可能说明蛋白应该是和填料结合了,而不是与 Ni 离子.取 10uL 的 Beads 煮样跑胶上面不止有我的蛋白质,还有好多杂带,这是怎么回事?什么蛋白质为什么那么容易与 Ni-柱填料结合?为什么????!!!!!!我的裂解 Buffer: 50mM Tris pH 7.2(也试过 8.0) 1% Triton 0.5M NaCl 酶的等电点可能在 5.6 左右.

洗脱缓冲液 p H 过高不利于洗脱,降低 p H 到 6.5 左右试试,平衡缓冲液也是用同样 pH,此外上样洗脱等不能时间过长,避免沉淀.我觉得也许是蛋白变性才这样,否则没道理

只知道人血清中某蛋白的分子量 1.1 万左右,等电点大于 4,其他信息不知.请问怎样纯化该蛋白?

没特别的方案,如果我做会先选择阴离子交换柱,浓缩粗分,然后选择凝胶柱子去分离,如果还不纯可以选择高分辨率的填料或者疏水,纯化只能去摸索.特别是未知的蛋白

chromatography 兄: 请教一个问题,当样品中硫酸铵浓度较高时,是否会影响分子筛层析对蛋白质的分离效果?

应该不会,只要样品是澄清的应该没关系

chromatography 兄: 你好,我想问一下 Toso-Haas 生产的 Toyo-Pearl 650M C4 凝胶这种胶是乙二醇和异丁烯酸型聚合物,用丁基基团衍生化的。请问: 1. 这种胶是疏水介质 还是反相介质? 2.疏水凝胶是否可以用作反相介质用,像这种介质? 3. 在做疏水层析时,PH 对整个层析有何影响? PH 高低对蛋白的吸强弱是否有规律? 4.书上提到的样品要脱气,但是里面有蛋白,容易起气泡怎么办? 5.能否发一些反相和疏水层析方法原理、介质的种类与区别的资料。

没用过这类填料,Toyo Pearl 650M-reversed phase HPLC (C4)应该是反相填料,反相和疏水色谱填料是有区别的,前者配基密度是后者的 10 倍左右,表面全是疏水基团,而疏水色谱填料是在大多亲水表面上有小部分 疏水基团,所以前者纯化蛋白作用力很强,容易导致难洗脱不可逆变性,而后者温和,一般不会导致变性,所以后者常用于蛋白纯化,前者用于分析多.两者难互相 代替. 3.中性 pH 可以保持蛋白质的活性,当 pH 偏碱性时,有利于洗脱. 4.样品其实可以不脱气,在常温放 30-60 分钟和室内温度一致即可,材料可参考 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载.

问: 我用 Affigel-Blue 精制我的蛋白,结果我用 1.5M NaCl 不能将我的目的蛋白完全洗脱下来。这是什么原因阿? 有什么好的解决方案吗? 我还可以加大洗脱盐浓度吗?

你可以改变 pH 看看,也许 pH 不一定很合适.再加大盐浓度也不一定能洗在来,如果你的目标蛋白是酶,也可以采用辅酶特异洗脱.染料亲和作用机理复杂,所以除离子作用外还有别的作用力,或者吸附太牢固

“辅酶特异洗脱”我还从来没用过,不知道您指的是何种物质? 望赐教 Affigel Blue 可以用这种方法吗? 这样会不会在酶中引入新的杂质蛋白啊?

键看你的酶,如果是需要 ADP,AMP,NAD ,NADP 等这些做辅酶的话,那就可以考虑用它们做特异竞争洗脱,如果不是那就不能用,改变 pH 看看在怎么样的条件下更容易洗脱.此外要注意蛋白稳定性,如果沉淀在柱子上用盐是洗不下来的

Chromatography 兄, 你好 ! 我最近在纯化一个抗肿瘤蛋白; 其中用到疏水层析, 以前都做得好好的, 最近发现, 疏水层析上样的时候, 蛋白质的峰还挺高的, 可是洗脱的时候, 却发现一个峰 都没有, 基线很平, 一直洗到盐浓度为 0 还是没有峰出现, 最后, 用水洗柱子, 发现出了很高的峰, 洗下来的蛋白电泳后发现由我们的目的蛋白, 也有很多杂蛋白。很奇怪!!! 因为我们以前没有出现这种 情况 这到底是怎么回事啊

换个新柱子试试,如果和以前一样,那说明柱子需要再生清洗,如果效果还不好,那就得重新摸条件.我觉得还是填料脏的可能性大

chromatography 老师: 您好,我有一些蛋白质纯化的问题,可由于我没有做过实验,什么都不懂,问题可能在您那根本不是问题,请问有什么问题可以通过您的雅虎邮箱和您联系吗? 您经常打开邮箱吗?

最好是电话或者邮件联系,邮件有时候说不清楚, [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 主页下有我详细的联系方式

Chromatography 你好！我要分离纯化的是几丁质酶（是从土壤中筛选的细菌和真菌的胞外酶），对于这方面你有什么建议，我头一次接触分离纯化方面，这几天也浏览了相关的帖子，但还是没有底，主要是填料方面不能来回试哪一种好用（由于经费的关系），而且对于几丁质酶的纯化方面的资料相对很少，现在初步决定用 DEAE-纤维素和 sephadexG-100，想听听你的建议！谢谢了！我这个比较着急！对了，还有是不是我必须要知道我这个酶的等电点才能确定缓冲液的 pH 值？

最好是直接选择几丁质树脂做亲和纯化即可，你查查文献，我们倒是有这个产品，如果能用亲和是不错的选择，常规的方法你选择的填料型号太老，最好选择 DEAE 琼脂糖凝胶和刚性更好的凝胶过滤填料，此外不知道等电点难选择离子交换柱子

chromatography 兄：你好，我在纯化一种胞内酶，文献上用的是 Q Sepharose Fast Flow column，不知道有没有类似的国产填料？

有，Q 琼脂糖凝胶 FF 就可以，[www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载下有目录和一些纯化相关的材料

chromatography:你好。问 2 个特别弱智又困扰许久的问题。1.我提取的线粒体裂解后，15000g 离心后取上清，放-80 度，过一段时间取出来之后发现有沉淀，为什么呢？沉淀是为裂解成蛋白的线粒体吗？弃之是否会影响测浓度的结果？ 2.蛋白浓度仅有 2mg/ml，要想浓缩成 5-10mg/ml，用什么方法比较好？我的目的是用作 2D

冷冻后再溶解有的样品会沉淀，特别是分子量大的东西，你取沉淀和上清跑电泳跑电泳就知道了，沉淀原因是冷冻的冰晶导致样品变性而沉淀。可以用高浓度的甘油 代替水也许好点。要不就冷冻干燥。浓缩方法最简单超滤离心，也可以样品放透析袋中外面用 PEG 粉末浓缩，主要是看你的样品多少和稳定性决定的，没特定说什么方法更好

老师你好，我这里有个蛋白，56KD，8M 尿素和 6M 盐酸胍都无法溶解，楼主你有啥建议没有？有没有什么促溶的方案？我再生了 GE 公司买的 HIS 预装柱，从贵公司也买了葡聚糖介质的镍填料，想问问您，能用 NTA 的方法再生挂镍不？

每个公司都有说明书的，有再生的方法，当然选择 NTA 的方法再生挂镍也可以，你要有我们的产品那应该有纯化光盘，里面都有，没有的话可以上 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中去下镍琼脂糖凝胶说明书，不是葡聚糖介质的，不溶解你可以加 1-2mM 巯基乙醇，也许会好点，此外包涵体通常刚制备的好溶解。冷冻后很难溶解，此外也可以考虑加写 triton 等表面活性剂试试

看了一下光盘，确实是镍琼脂糖凝胶 FF，2.5ml 的。请问，它的配基是 IDA 吧？看说明上开始说了一堆 Ni-NTA 的优点，弄的我都有点迷糊。原来我们买的 GE 的小预装柱，按照《《精编分子生物学实验指南》》上的 NTA 再生方案，先走的含 6M 盐酸胍的溶液，然后水，然后 SDS 溶液，结果在柱子上形成了大量沉淀，堵死了（应该是盐酸胍没洗干净），请问有没有办法挽救？年前购买镍琼脂糖凝胶 FF 的时候，贵公司赠送了几个其他小包装介质，其中有个 Ni-RESIN HP，是不用装柱子的，请问这个和镍琼脂糖凝胶 FF 有什么区别？如果装柱使用效果能差多少？我这有台 AKTA 的系统，用惯了，还是喜欢装柱子用。还有就是我上边问的包涵体促溶的问题，因为带 HIS 标签，打算用镍柱纯的，曾经试过加巯基乙

醇，结果介质变为深红色，准备加 triton 试试，不知道会不会对镍柱有影响

镍琼脂糖凝胶 F F 的配基是 I D A,而镍 NTA 琼脂糖凝胶 F F 它的配基是 NTA 的,我们的说明书现在写在一起了,此外把这两填料的特性做些对比而已.你用盐酸胍洗后应该用水洗去它再换别的溶液,如果现在有沉淀你可以用水或者用低 pH 的洗盐酸胍应该很容易溶解的,慢慢洗应该没问题.你也可以倒冲柱子,这样能好点.有问题可以直接写邮件或电话都可以. Ni-RESIN HP 和镍琼脂糖凝胶 F F 本质没区别,只是颗粒更细,而且没内水体积,所以不需要平衡可直接和样品混合进行分离纯化,要是清洗干净和过柱子应该没很大区别,适合那些喜欢用离心操作而又没机器和柱子的用户.普通的镍琼脂糖凝胶的填料不能耐受太高浓度的巯基乙醇,也不能耐受太大体积的巯基乙醇样品,同时 1-2mM 应该可以,如果柱子变色是挂不上蛋白的,所以 NTA 的能耐受还原剂浓度更高,更稳定点.你最好把红色的洗到用 EDTA 溶液,重新螯合镍离子才好用. P B S 缓冲液, 和 Tris-HCl 缓冲液没太大区别,都可以

想请教有没有溴化氰活化的琼脂糖凝胶的宝贵资料,有关原理,使用等。国内不知哪家公司这种柱子好?

这是比较常用的活化填料,是溴化氰活化的琼脂糖凝胶不知道你需要偶联什么东西,它只能连带有氨基的配基,发一些材料给你做参考.我们倒是有这样的产品,而且不需要溶胀和清洗,直接加到偶联配基溶液中即可,操作更简单,也可用 NHS 活化琼脂糖凝胶。

我的一个溶液中有两种蛋白:用 IEF 分析,一个等电点为 4.6 另一个为 6.2;因此我设计我将上柱条件设计为 5.5,这时一个蛋白带负电,一个带正电。然后我将 SP-650M (强阳离子柱)和 SQ-650M (强阴离子柱)串联,将蛋白混合液上串联柱,以希望将两者分开。结果洗脱液单用分析,两种蛋白均能结合 SP-650M 和 SQ-650M;怎么会这么奇怪?

改变 pH 到 5 只过阳柱子,这样 4.6 会穿透,而另外被吸附,或者 5.5 时,只过阴柱子看看能不能一个穿透一个吸附,这样比串联好

chromatography 老师:你好,有个问题请教一下,是关于分子筛装柱的。我使用 sephacryl S200 装柱 1.6×100 柱效测下来只有 3000 多。我是严格按照说明书上使用两步流速,还使用了装柱器,效果还是不好。在此问一下怎样才能提高装柱的柱效,望老师指点其中关键

这个填料的颗粒不算很细,所以分辨率也不会太高的,具体的数据我没测过,你可以问问 GE 工程师看看同样填料最高能做到多少,此外你也可以直接上样品试试,我觉得有时候测定也是有误差的,还是以实际效果为准,当然还需要有很好的柱子才能有高的柱效

我是一个新手,请教一下,我仅知道血清中某种蛋白的分子量,需经过哪些方法才能将其纯化?有没有详细的步骤及原理说明

仅知道有限的信息那你只能选择常规的离子交换,凝胶过滤和疏水的方法去纯化,详细的步骤你可以参考类似的文献即可,此外你可以读一些相关的实验书和蛋白纯化的书,在这个帖子里不只一次提到有关那些纯化的书,你搜索一下,此外可以去看看 www.wsac.cn 资料下载中生物大分子分离纯化策略会有帮助,如果你周围有我们的用户,有张纯化的光盘里面也有很全的纯化手册和材料,网站资料等.如果没有,最简单去图书馆看看有关纯化的书或者去书店找

我有一个 GST 融合蛋白用 GST 亲和柱纯化问题。8ml 的填料在纯化 GST 蛋白时，2L 的菌液可以得到 40mg，纯化融合蛋白时 2-3L 只能得到 10 多 mg 的蛋白。菌体处理：按 100ml 用 4ml PBS 悬浮，溶菌酶加超声破碎，目的蛋白可溶，表达量也可以。上样流速 1ml/min，流穿仍有目的蛋白，柱子的颜色变的很深，20mM 的 reduced glutathione 洗脱，柱子的颜色变化不明显，3M 的 NaCl 也不用洗掉，只有用 6M 盐酸胍才能洗白。而纯化 GST 蛋白时，柱子颜色变化不明显。破碎前加过 0.2%-1% 的 Triton X 100，1mM 的 PMSF，上清过滤后加过 1-2mM 的 DTT，我想请教一下这其中的原因

颜色我觉得也许是色素或者一些别的杂质,而穿透是因为蛋白浓度低,不可能完全吸附,你可以流速更低或者多用点填料,这样延长填料和样品的时间,或者干脆循环,也许可以减少穿透,你表达量不高,所以吸附效率也不会太高的,循环上样也许是个不错的选择.此外不知道你问题是什么,请说清楚点

我的意思我的蛋白的表达量不低，但就是结合不完全。之前有用 0.6ml/min，并流穿重复上样一次，流穿仍有相应条带。这是不是说明有部分已经变性（但仍然可溶），所以结合不上，因为 GST 亲和需要活性蛋白。柱子上的深色物质我怀疑也是蛋白（下次超滤掉盐酸胍后电泳检测看看），有没有可能是操作的原因（超声，Triton X，温度，pH，长时间等）使目的蛋白变性在柱子上导致不能被谷胱苷肽洗脱？我看贵公司资料中用等使 Tris 缓冲体系，pH 是 8.3，跟我用的体系的效果有什么区别？

结合不完全是很正常的,因为浓度低,此外结合还有效率问题,有的蛋白也许 GST 部分没活性,所以别太强求全都挂上,带颜色的部分你可以跑电泳看看,其实缓冲体系不重要.但是洗脱和平衡的 pH8 点做为好,此外你可以在样品和平衡缓冲液中加入 1-2mM DTT,这样可以增强填料和 GST 的作用而更好吸附

纯化出的 HIS-蛋白，buffer PH 值是 8.5，能否直接加在细胞里做功能？如何去除蛋白里的咪唑？通过什么方法能把 PH 值变成 7.4？

最好是能用透析或除盐柱子交换缓冲液同时去咪唑,避免 PH 值和咪唑的干扰.改变 PH 值可以直接用低浓度盐酸调就可以

chromatography 兄：我最近准备纯化昆虫血液中一群脂蛋白,由于这类蛋白分子量在 28kD 到 31kD 之间,等电点在 6.0 到 8.5 之间,而且它们的很多理化性质非常相似,因此很难将其分离开来.我考虑了很久一直为能设计出来一个好的实验方案(以前做过一次,先过疏水,然后过凝胶过滤,最后过离子交换,但是只能得到这群蛋白质,而不能得到单一的一个蛋白).我又是做蛋白纯化的新手,望您能给我提点宝贵的建议.先谢啦!

不能得到单一蛋白那你可以选择高分辨率的填料,这样效果也许更好,此外仔细摸好纯化的条件,此外如果你不需要活性也可以用 HPLC 柱子去做制备,HPLC 凝胶柱子可以做少量制备而且能保证活性.我觉得还是看具体的条件,思路是没错的

chromatography 兄：我之前纯化该群脂蛋白时,用的填料都是 Amersham 公司的,分别是 Butyl Sepharose 4B,G-75,和 DEAE Sepharose Fast Flow,您帮我看看这些填料适合不,我纯化过程用

的缓冲液 pH 为 7.5 另外,因为我要保证蛋白的活性.我要纯化出来制抗体用,不知道用 HPLC 做能否达到我需要的量,还请您多指点

填料应该没什么不对的,但是具体的实验有很多细节,我觉得最好能优化纯化的条件,做抗体变性的也是可以的,不需要活性,此外你可以选择 HPLC 的凝胶柱可以保持蛋白的活性,多做几次应该能做到你需要的量

请问将 G25 的干粉溶胀作柱子怎么弄啊? 说明书没说清楚。用水溶解在室温下 3 小时就行了吗? 还有请问 G25 的最大线性流速是多少, 耐压多少?

说明书应该比较清楚,你可以直接用水泡过夜,然后脱气装柱子即可,3 小时也差不多可以.线流速也就 60-150cm/h,不同颗粒大小不大一样,耐压不高,应该小于 0.1Mpa

还有关于 NI 柱的问题: 洗脱时, 100mM 的洗脱产物占了约 80%, 是非目的蛋白, 200mM、300mM 的洗脱产物才是目的蛋白, 但总共只占 20%。这是不是认为可以在样品中加入 100mM 的咪唑, 使杂蛋白不能被结合上去, 免去洗杂但麻烦, 同时使柱子对目的蛋白对结合容量提升 (杂蛋白不能结合, 省下来对结合位点就可以结合目的蛋白了)?

对, 应该这样做。同时可以直接用 300-400mM 洗脱彻底即可

今天这样尝试了一下, 从峰形图来看, 效果不错, 不过看明天电泳结果。又有一个问题: 前几天 100mM 咪唑洗脱产物我看有少量目的蛋白, 就想超滤后再过 GST 柱。结果每次超滤时就产生沉淀, 以前以为是洗脱液不干净, 于是今天超滤前已经用 0.45um 过滤, 结果还是产生沉淀, 不知是何缘故。同时进行的 GST 洗脱产物超滤则没有问题。不知跟咪唑或低温 (4℃) 有没有关系? 那么 Ni 柱咪唑洗脱产物中的咪唑是如何除去的?

理论上超滤应该可以去除咪唑,也可以过除盐柱去除即可,透析也可以,沉淀也许是因为蛋白变性,你把沉淀再溶解做电泳看看有什么东西就可以知道怎么处理.此外穿透如果有目标蛋白可以直接稀释一点再过镍柱也可以,没必要换个柱子

chromatography 老师,不好意思,我又有问题了,还是关于上次所问的蛋白的话题 我用表达一个蛋白,是膜蛋白,PI8.0 左右,60KD 主要溶于 SDS 中,用阴离子交换柱回收后基本没有起到分离效果,我老板想让我先透析浓缩后再过分子筛,我想问一下,在这种情况下,应如何透析比较好,透析 外液如何选择,我现在保存蛋白溶于 PBS 加 1% sds 中。再次谢谢

其实你可以溶解在 Triton 等非离子型表面活性剂中,这样可以避免表面活性剂干扰,这样过离子柱子应该能好多了,透析可以直接用你的保存缓冲液即可,过柱子也选择同样的缓冲液平衡试试.不过凝胶柱子也不一定分得很开,要想得到纯点的样品最好是配合离子交换和疏水

chromatography 兄: 您好,我现在对纯化后的样品做 HPLC-SEC 测纯度时候,用溶解纯化后的样品的缓冲液做对照也做 HPLC- SEC。现在问题是我的样品的杂峰刚好合对照缓冲液的杂峰一样 (出峰时间合出峰高度都一样)。请问我的样品怎么来确定纯度? 如果抵消掉缓冲液的杂峰,样品的纯度就很高。可能是我纯化时用的缓冲液质量不好,如果这样的产品去报药的话,他们对缓冲液里面的峰怎么界定?

那你最好能选择好的原料使缓冲液杂质少,这样可以避免没必要的麻烦,你也可以换一种缓冲液试试,对于报批我不是很熟悉,你可以发到外面问问

Chromatography 老师, 后来我们用乙醇把柱子再生清洗了, 现在又发现了新的问题: 蛋白盐析下来的沉淀, 用 2N 的氯化钠, PH7.2 的 20mmol 的磷酸缓冲液重新溶解上样 (这里我忘记调节 PH 值了, 重溶液的 PH 值伟 6.86), 接着用 2N 的氯化钠, PH7.2 的 20mmol 的磷酸缓冲液, 以及 PH7.2 的 20mmol 的磷酸缓冲液联合线性梯度洗脱, 电泳发现, 穿过峰中有大量的目的蛋白, 而且目的蛋白很早就洗脱下来, 峰形也不好, 最后用水洗柱子, 洗下来的蛋白电泳后发现也有我们的很多的目的蛋白, 当然也有很多杂蛋白。这是怎么回事阿? 怎么目的蛋白大量的不挂柱, 也有部分挂柱, 部分结合特别牢固的阿

穿透有目标蛋白比较常见,你可以减少上样量,降低样品浓度,减少流速,这样可以结合更好,洗脱最好是先用平衡缓冲液洗到基线再开始做线性梯度,我觉得也可能你的样品溶解不好或者容易沉淀才这样,所以别把样品浓度配太高,如果只有水洗能有蛋白,那也许作用力太强了,起始盐浓度可以降低点,多试试吧,我觉得样品的问题要留意

但是穿过中的蛋白很多啊,会不会不是上扬量的问题,而是有一部分不挂柱阿,而且目的蛋白很早就洗脱,也不正常;至于样品的溶解度,我确实有疑问,因为我们疏水洗脱下来的样品要接着上 sp 的柱子,所以我们要浓缩,脱盐(用 PH7.2 的 20mmol 的磷酸缓冲液),在脱盐的最后,发现有一些混浊,感觉有点沉淀,会不会是磷酸缓冲液体系不适合呢??你说的“只有水洗能有蛋白,那也许作用力太强了,起始盐浓度可以降低点”,这个起始盐浓度具体是指那里的呢

从你说明的情况来看还是你选择的 pH 不合适或者蛋白没溶解好导致柱子上的异常,所以解决溶解问题再上柱子,建议用不同的 pH 或者适当加点甘油,一定要澄清样品才好做纯化

chromatography 老师:是这样, Triton-100 我以前实验就已经尝试了, 1% 2%浓度的基本都不溶, 主要只溶于 SDS, 一直都想采取离子交换和分子筛方式, 不过离子交换一直都不成功,现在样品加了 SDS 后,用 elution buffer 都洗不下来了,包括杂蛋白,都是在 elution buffer 洗脱后再加了 start buffer+1%SDS 才能将蛋白洗下来,包括杂蛋白一起,基本就没有起到分离的效果,我现在就是打算采取过两遍分子筛的方式尝试一下,非常想听听你得意见

如果是这样,那也只能选择凝胶柱子,但是 SDS 是会和蛋白结合的,难去除,也许会影响凝胶行为,你先做做看吧,我没遇到过这样的蛋白,有问题再讨论

chromatography 老师:又要麻烦您了,还是作柱子的问题。G25 干粉用 0.15M 的 NaCl 溶涨,室温下过夜,脱气。装 XK16-40 柱,用 50mM 的 Tris, 10ml/min 压柱子,柱压保持在 0.24mPa 左右(不接柱子时 10ml/min 也有 0.2mPa 的压力),冲 5 个柱体积以后,将活塞压紧,柱体积 50ml。问题是在 4 度冰箱中放约 8 个小时后,发现柱身上有白色的小花样的不规则纹理(分枝状,约 5mm,推测可能是裂纹)大约有 5-6 处,怎么办啊,是溶涨不充分,还是我的操作有问题?如果是压力太大压坏了,重装可以解决吗。

这样的填料根本不能耐受 0.24mPa,同时流速也到不了 10ml/min,建议你用 3-5 毫升/分钟压柱

子就可以,压力过大一但没压力会反弹流速反而不快,你重新装看看,溶胀应该问题不大,但是为充分最好用水

你好,想请教您,我现在准备作亲和层析,本人是新手一个,请问亲和层析的柱子哪里有卖的啊,急用,不要容积太大,5毫升的就可

自己找个注射器,下口堵点棉花,填料不漏即可,有条件可以买好的柱子,转换头能到底,这样1.6x20cm的柱子可以任意装5-40毫升左右的填料.不过这样的柱子好象少见,我们倒是让他们设计过

是不是我自己找个注射器就可以啊,下面只要不漏就行了,别的有什么要求吗?要买的话哪里有啊?

对,只要不漏填料即可.没别的要求,这样手工操作即可.要买的话很多地方都有层析柱子,如果需要连进口的机器那就需要注意接口一定要匹配

我的目的产物在蛋清中表达,但其分子量与卵清蛋白相差不大.SDS-PAGE中看不到特异的目的条带,应该采取什么纯化方法才能更好的得到我的目的蛋白呢?

如果分子量差不多那你可以选择离子交换或者疏水试试,也可以多看看文献,看通常都怎么分离卵清蛋白,这样也许有一些办法能把它去除也好分一些

你好:我用His标签与Ni结合的方法来纯化蛋白.最近遇到一个问题是:蛋白与Beads结合不上,我的操作是:buffer 5mM咪唑,20mMTris-HCl,500mMNaCl,PH7.90,4度混合,1.5小时,请问有什么方法能使蛋白结合的更多?

可以别加咪唑.提高蛋白的浓度,pH调到9这样也许更好点.实在还挂不上,换颜色更深配基密度更强的填料.或者在变性的条件下去吸附

chromatography 兄,新手有一个问题:老板让我在牛脑中提个小肽,有活性就行,文献上大部分都让先过G50,然后在走离子交换,可是师姐说先走离子交换,我不知道他们是从哪方面考虑的,我想请您根据您的经验给我这个新手点建议,我想少走弯路,请问我应该注意些什么?非常感谢!

离子交换处理量大,可以富集样品,所以放第一步应该是不错的选择,但是样品需要盐浓度不高才能挂上,你可以多看看实验书或者问周围熟悉的人,也可以看看离子交换层析手册,遗憾篇幅有限,只能自己去看看一些基础的材料

请教楼主:我有一个融合蛋白,pET-32a的载体,BL21表达.过了Q柱和his-亲和层析柱,但是我的目的蛋白下面紧跟的几个蛋白条带始终去不掉.请问可能是什么原因造成的,我还可以怎么做呢?谢谢!下面是我的蛋白电泳的图,第9、10泳带是我的目的蛋白和杂带

也许是蛋白降解,最好破碎后马上纯化.或者是因为别的作用力导致非特异吸附,样品和平衡缓冲液中加0.5-1%的土温,这样也许可以去掉一写杂带,同时平衡缓冲液洗杂带的时候要多

洗几个柱体积,此外最好多做几个咪唑浓度做阶段洗脱,详细方法可以参考 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中镍琼脂糖凝胶说明书

chromatography 兄:您说的对,应该先除盐是么,还有因为是未知的,所以离子交换需要摸索 PH,所收集的样品再去测活性,太麻烦了,有没有什么简单的办法,顺便给我介绍几本离子交换的书,速成的那种,谢谢阿!

看样品而定,你可以参考<生化实验方法与技术>,没速成的,最好是看文献怎么做的去做,多问问周围熟悉的人

chromatography 兄:我刚刚接触蛋白的分离纯化,想问几个很菜的问题,希望你不吝赐教,谢谢!我要从乳汁中分离乳铁蛋白,分子量约为 76kd,等电点 8.7,高手给指点一下我用什么方法提取纯化,处理的量可能比较大,该用多大的柱子,什么填料,这些东西哪的比较好?

没做过,我觉得最好的办法是去查文献,然后按文献的操作试试就知道.具体实验问题再讨论

chromatography 老师,你好.我没有做过蛋白纯化,现在我想重组一个蛋白(抗原)来检测一些病人血清中的抗体.重组质粒用的是 PET30a(就是带 His 的),cDNA 长度 600bp 和 1600bp.我想问一下,蛋白诱导表达出来以后是用哪种纯化方法效果比较好?有没有啥试剂盒可以推荐的?所花时间和价格大概是多少?

直接用镍柱去纯化即可,然后把抗原偶连到活化填料上去纯化抗体.但是需要重组蛋白有足够的量,差不多需要 50-100 毫克,这样去做免疫亲和柱子才好.纯化带标签蛋白最简单的那也就 600 元一根预装柱子,自己配缓冲液,很简单,都有说明书,时间顺利的话也就几天的事情,然后去咪唑,偶连到 CNbr 活化或 NHS 活化的琼脂糖凝胶上,纯化抗体和填料合成也差不多几天能完成,价格 5 克=15-20 毫升,1200 元,具体的说明书和材料可见 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中的对应产品说明书

求助:纯化不出来!各位前辈们:我利用 pET 系统表达木糖酶,发现有表达,而且破碎的上清有蛋白的活性,然后用上清直接挂镍柱,但是就是不能挂出来,然后以为可能是没有复性导致的,然后复性并挂柱,可是还是没有结果.现在不知道什么地方出问题,请教各位高手,可不可能是表达的时候 6-His 被切掉了呢?盼回复!

你用的是哪家公司的填料呢,换一个颜色更深,配基密度更高的填料试试,此外样品的浓度别太低,填料也别太少,标签应该不会丢的.如果实在不行那只能在变性条件下分离,或者也许可用木糖做配基做亲和填料纯化

chromatography:又来请教您了,我用 DEAE FF 纯化经过硫酸铵粗提的昆虫血液蛋白质,我用的柱子为 24/40 的,装柱高度有 18cm 高,样品浓度大约为 40mg/ml,我上了 10ml 样品,但是在洗脱 40ml 开始蛋白质好象都下来了,后来就再也没峰出现了.我用的缓冲液是 0.05M PBS pH7.2,洗脱用梯度洗脱,从不含氯化钠到含有 0.5M 氯化钠.请问这是怎么会事呢,是不是我的上样量太大了,还是其他原因导致我的蛋白挂不上呢

硫酸铵沉淀后蛋白需要除盐再上离子柱,否则挂不上,同时留意样品和平衡缓冲液的 pH,此外用 1M 盐洗柱子看还有没有没下来的东西

我透析除过盐的,我今天用 1M 盐洗了柱子,只有一个比较小的峰出现,后来就什么也没有了. 我只是没有测量样品和平衡缓冲液的 pH,我硫酸铵沉淀后的样品是用 相同的缓冲液重新溶解的,是不是我上样前还应该检测一下样品的 pH 呢?如果检测和缓冲液不同,应该用什么来调节 pH 值呢,谢谢!哦,随便还请教您一下,我 这样的柱子用多大的洗脱速度比较好呢?我用的 2ml/min,会不会太小了呢

上样前当然需要检测样品的 pH.最好的办法是沉淀直接用上柱的缓冲液溶解,然后再用同样缓冲液透析.2ml/min 不算小

请教高手一个问题: 我做的 GST 融合蛋白, 纯化后想以凝血酶进行切割, 不知道应该用多少量, 酶切多长时间, 有没有温度要求? 我用的凝血酶是别人用过的, 粉状, 上面只有 1000u 的标记, 所以我也不太清楚量是多少? 那位高手有没有好办法?

这个不很清楚,发外面问问吧.这个网站下就有酶切的说明书,你可以看看,也可以问公司的人 [http://wolfson.huji.ac.il/purification/Purification\\_Protocols.html](http://wolfson.huji.ac.il/purification/Purification_Protocols.html)

chromatography 老师再问一下, 纯化后的 gst 融合蛋白酶切完了后, 再分离目的蛋白的时候是不是可以再上一次亲和层析柱, 然后用 wash buffer 洗脱.收集第一个蛋白波峰就可以了? 我看有些人做完酶切后还透析了一下, 才上的柱.我用的是 PIERCE 的 B-PERGSTSpin Purification 的层析试剂盒, 不知道用不用透析啊

如果洗脱后的蛋白直接酶切, 里面还有谷胱甘肽肯定是需要透析掉才能再次上柱子, 不过我觉得这样也很难分离很好, 因为 GST 会和谷胱甘肽结合难去除. 这样挂不上柱子. 我觉得最好的办法还是直接吸附目标蛋白在柱子上洗去杂质, 然后酶切, 这样可以避免一些杂带

可能我说的不是很清楚. 现在得到的蛋白样品是已经通过上柱纯化过一次的 gst 融合蛋白, 纯化效果不错, 条带较单一. 下一步我想用凝血酶切割, 是否可以用前面所说的方法将 GST 和目标蛋白分离. 拿到我需要的目标蛋白?

你的已经洗脱那就只能试试能不能再过柱子去除 GST 和没切的 GST 融合蛋白,这样没做过. 如果分不开,你也许可以选择离子交换等方法

谢谢! 明白了. 我打算试试您的建议, 更方便一些

别客气,因为洗脱后的样品想再挂上亲和柱子确实有难度或者不完全,所以我没看看这样做的很成功的, 我的客户量的好象都是在柱子或填料上切的。

chromatography 老师:再请教一下,我们实验室有室温 20 和 80,这两个有什么区别么?我应该用哪种呢?

应该差不多. 随便选择一种, 只要能溶解即可

两个问题，1。我用 perise 公司的 detoxi-gel 填料，上样的时候把蛋白在柱子上温浴了 30 分钟，结果洗不下蛋白，估计蛋白和内毒素被一起粘在柱子上了，说明书上说可以用 1% 的脱氧胆酸钠活化，估计可以洗脱内毒素和蛋白，但是现在如果用 1% 的脱氧胆酸钠洗脱就起不到分离作用，有没有其他方法呢？ 2。请问如果是做符合 gmp 的药物，需要用 ge 的填料，比如 g-25 ,q-sepharose,cheating sepharose 等一般能用几次呢？国家 fda 有没有规定这些填料的使用寿命或次数呢？一般药厂大规模使用用多少次呢？另外你了解美国得 fda 对这些填料得使用次数有没有特殊得规定那？

有关去内毒素的去除我们有个材料在 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中去内毒素填料参考,其实不一定非要在柱子放置,这样处理量小,我们用循环过柱或者批处理的方法,这样可以提高效果,你的问题我怀疑是温度不当导致沉淀,或者因为填料的非特异吸附导致没洗脱,你可以用盐酸胍去洗应该可以.去内毒素的亲和填料可以在样品中加 0.2M 左右的 NaCl,这样避免回收率低.你也可以用我们的方法去用你的亲和填料,因为结构差不多一样。填料的寿命和你的样品及维护等有很大的关系,我看的材料说如果柱子的效率降低到只有原来的 60%左右的时候就需要更换,具体的这方面好象没特别的要求,关键看你做的药品合格即可.报批的事情不是特别熟悉,你还是问问权威机构吧,或者发外头讨论,我只做填料合成和生物大分子纯化

chromatography 兄：我想请教一下，含铜的金属蛋白有没有亲和层析的材料？

你可以直接把镍琼脂糖凝胶用 EDTA 洗去镍离子,重新螯合铜离子,然后平衡把你的样品调 pH 到 8 左右,上柱子看能不能吸附,理论上它应该有作用力,如果不能也可以用低浓度 EDTA 做透析液,把你样品透析去掉铜离子,然后再用缓冲液透析,这样的样品过铜离子柱也许能吸附,而后得到蛋白再用结合铜离子就可以了.理论上是这样,你可以试试,只要结合铜离子是螯合形式的,这样方法应该可以纯化

我是个新手,想用 Blue sepharose 6 Fast Flow 去除白蛋白,可 binding buffer 和 eluent 的配方,在使用手册上好象没明确说明,该用什么啊??多谢了啊

binding buffer 普通的 20-50mM pH5-7 PBS 或者 PB 或者 tris-Hcl 缓冲液都可以, pH5 左右载量最高,洗脱可以用 20-50mM pH7 PBS 或者 PB 或者 tris-Hcl 缓冲液加 2 M NaCl.可以参考我们的 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中的蓝色琼脂糖凝胶 FF 说明书

我是一个刚涉及蛋白分离纯化的学生,看了各位的问题和楼主的解答受益匪浅,但还有很多看不懂的地方,楼主能不能给提供一些实用的蛋白分离纯化的书或资料,谢谢!

[www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中也有一些材料,会对你了解纯化有所帮助.书可以参考:<蛋白纯化与实验鉴定指南>、《生物工程下游技术》、《酶工程》、《酶制剂工业》 《生化实验方法和技术》,《蛋白纯化实验指南》,《生化制药学》,《药物蛋白质分离纯化技术》,《蛋白质纯化技术及应用》,《protein purification》等,还可以多看看一些纯化的手册和产品说明书

请问一下：我两个蛋白质理论预测的 PI 值为 5.9 和 5.3，用阴离子离子交换柱缓冲液的浓度分别用 5.5 和 5.0 可以吗？是不是挂柱比较困难？ pI 值为 5.9 的适合用阳离子交换柱还是用阴离子交换柱？

平衡缓冲液 pH 大于蛋白等电点时蛋白带负电荷,该选择阴离子柱子,而平衡缓冲液 pH 小于蛋白等电点时蛋白带正电荷,你的蛋白偏酸,选择阴柱子也许更好保持蛋白活性,平衡缓冲液 pH 大于蛋白等电点一个单位以上为好,太近难吸附

我现在有个蛋白, 6 个组氨酸标签在这个蛋白的中间部分, 我用 Ni 柱纯化破碎上清, 能出来么, 应该做什么条件

做出来那还需要什么条件呢。

chromatography 兄: 又来麻烦您了,我纯化昆虫血液中的 30k 蛋白,已经用 DEAE FF 过柱子,收集到了我的目的蛋白(大约有 40ml),我下一步想用疏水层析进行纯化,那我的样品在上样前还需浓缩透析吗,过疏水的缓冲液和现在的是一样的,都是 PBS

不需要透析,直接在样品中加硫酸铵调 PH 到你平衡疏水柱子的缓冲液一致就可以了,疏水需要高盐吸附,低盐洗脱,所以普通的缓冲液没高浓度的盐挂不上,看看说明书和实验书上,参考它们的方法或文献

chromatography 对于柱层析当中经常用到的磷酸盐缓冲液, 我看我的老板有时候说用 20mM 有时候说用 50mM, 这个有多大的区别阿如何确定磷酸盐缓冲液的浓度呢

其实 20mM 就差不多了, 太高有的蛋白挂不上, 我记得曾经有个蛋白大于 5 mM 就挂不上了, 磷酸盐缓冲液适用阳柱, 而阴柱最好选择 Tris-HCl 缓冲液. 解决就好, 挂上去后需要用不同盐浓度做阶段洗脱, 太简单的条件不一定能分好, 你也可以直接透析上离子柱, 其实实验关键是看条件.

chromatography 老师, 像那些大肠杆菌发酵, 我做的是胞内可溶性表达, 那门对菌体进行高压匀浆破碎的时候, 100 g 菌体大概加多少的破菌缓冲液合适阿 (因为破菌液的离心时间要很长, 每次离心的体积也有限的); 而且我发现在沉淀里也有不少我们的蛋白, 是不是基本用高压匀浆破菌都会有类似的现象阿

你最好问问用过压匀浆破碎的人,按他们的方法做即可,沉淀有点那也很正常,因为破碎不能 100% 完全,所以只要差不多就可以,或者把沉淀再破碎一次也许好

chromatography 兄:又来请教您了.我用疏水柱纯化蛋白,填料为 Butyl Sepharose 4B,而我们实验室只有 24/40 的柱子,那我装柱最高好装多高?流速最好控制在多大呢?样品浓度大约在 10mg/ml,我一次上多少样品较好呢?谢谢了

短粗柱子就可以,你的柱子已经确定,装多少是根据你有的填料和需要做的样品而定的,通常 5-20cm 柱高都可以,要是样品和填料不多,选择 16/20 柱子 就可以,因为你要摸好条件再放大为好.流速上样 1-2ml/min,平衡和洗脱可以适当快点 3-5 都没问题,上样按 20 毫克/毫升填料就可以,多看看实验书,这样基本操作就熟悉了

请教 chromatography:使用阳离子交换树脂,样品的等电点 8 到 9,用甲酸铵 PH=7.6 做起始缓冲

液.上样后先用起始缓冲液冲洗,后用 PH5.1 的醋酸铵洗脱.我想请教样品的 PH 必须等于 7.6 吗?比它低可否挂柱呢?还有就是用 PH5.1 的乙酸铵做起始缓冲液,再用浓度更高的乙酸铵来洗脱,这样两种方法有差别吗,谢谢!

不一定必须 7.6,挂上就可以,你也可以用 PH5.1 的乙酸铵做起始缓冲液,再用浓度更高的乙酸铵来洗脱,具体的差别只有做了才知道.理论上只要条件改变,结果就应该有变化

请教 chromatography:不好意思,我还是不很明白.对于阳离子交换树脂,样品的 PH 比起始缓冲液低更容易挂呢,还是高更容易挂.再次感谢

比你等电点低 2 个单位左右即可,偏离太远不一定会挂更好,而且对蛋白稳定性没好处

谢谢 chromatography:如果树脂经起始缓冲液平衡以后,而样品不经起始缓冲液平衡直接上柱,对于阳离子交换来说,只要样品的电导性和 PH 值比 起始缓冲液低就能保证它能挂上吗?假如样品上样时的 PH 值为 7,而起始缓冲液为 7.6,样品的等电点 9.5,这样可以吗,不用缓冲液平衡样品能挂上就行。我是对一些原理还理解不了

可以是可以,但是缓冲液可以保证 pH 稳定,同时也便于重复你的实验,如果每次样品的 pH 不同也许会使实验结果难重复,所以样品最好和缓冲液的一致.多看看书,抱歉,这里只讨论具体实验的问题,系统的原理和常识的东西只能自己去看书或者看材料系统学习,否则难对纯化技术有系统了解,不了解原理就难以掌握具体的优化

chromatography 老师,比如我的柱子是让目的蛋白穿过去,挂住杂蛋白,那这样,我怎么知道这个柱子已经吸附满了呢?还有如果我的柱子是吸附目的蛋白,有一部分蛋白穿过去,那我怎么知道是蛋白有不挂柱的现象,还是柱子已经过载了呢?? 谢谢您了

那你就用电泳检测你的流穿样品,一有你的杂蛋白说明已经过载.如果目的蛋白吸附也一样,你可以先上样,再洗脱,如果洗脱什么都没有说明没挂柱,如果有说明 吸附了,那判断是不是过载,那你就时时检测流穿的样品,如果发现开始目标蛋白增多了,那说明已经开始过载,所以做纯化的时候需要先建立检测方法

chromatography 老师:我买了 GE 公司的 NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow,已经将的我多肽与其偶联,可是不知道怎么测偶联效率,说明书上并未提出,偶联完成后溶液中多肽的浓度该如何测定?谢谢

问厂家技术人员就可以了,简单的方法是偶连前的样品留样,偶连后离心取点上清,分辨检测浓度,假设偶连前浓度为 a,偶连后浓度为 b,这样偶连效率为 $(a-b)/a \times 100\%$ 即可,如果你是合成多肽带 SH,有专门的填料更温和快速偶连这样的多肽.选择活化巯基琼脂糖凝胶即可

chromatography 兄:你好!有个问题请教一下,我是一名本科生,现在在做一种酶的纯化,要用到 DEAE Sepharose FF 提纯.但买来以后发现是液体的,以前处理过固体填料,对液体不清楚该如何处理,敬请赐教!

参考说明书,直接装柱子用就可以。

请教 Chromatography:我已经用 DEAE-纤维素对茶多糖进行了组分分级,现在在现在准备用 Sephacryl S-300 分离纯化其中的一个茶多糖组分,但是我没有比较好的分离纯化的条件,以前都是用去离子水直接洗脱的,流速为 0.5ml/min,但是一直只有一个很不对称的峰,分离效果很不好。我的柱子的直径一般是用 1.6cm。我新买了一些 Sephacryl S-300,请问使用之前要做什么处理呢?谢谢!

首先确定你糖的分子量,然后选择一个适当范围的凝胶柱子也许效果会更好,所以你的效果也许是柱子装的不好或者是选择分离范围不对,对于糖这样线性分子不能和蛋白选择一样,最好能选择比蛋白分离范围小一到两个级别,这样分离效果才好.填料不需要特别处理,直接装柱子一次装成没气泡就可以

我想从血清中纯化 IgG 蛋白,先用硫酸铵沉淀,然后再透析,最后想再过一个 ProteinA 蛋白的柱子,可是硫酸铵沉淀的饱和度我没有摸索,直接从师姐那里抄的步骤,我今天才知道沉淀用的硫酸铵是要摸条件的,可是我用了饱和度为 50,和 33 的,然后全部丢弃了上清,不知道结果会怎么样?在我过柱子前,我还需要把透析的蛋白做那些处理较好?谢谢大家帮忙。我看在讨论的都是高手,就把我这个暂时和 PEG 纯化无关的问题拿来问了

可以不用硫酸铵沉淀,直接稀释样品上 ProteinA 蛋白的柱子就可以,如果一定要沉淀,那你可以用电泳检测就知道你沉淀的效果,有的免疫书上也有具体的方法,查查书,ProteinA 蛋白的柱子样品可以不透析,但是需要过滤同时 pH 和平衡柱子的一致就可以.方法可以参考 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中的重组蛋白 A 琼脂糖凝胶说明书就可以

chromatography 老师:你好,我现在正在做一个毒素蛋白的纯化,毒素蛋白的分子量为 105KD,刚买了 Sephacryl S-200HR (Pharmacia)填料,做凝胶层析。请问,有哪些注意事项?该用什么缓冲液?我实验室只有一个低压蛋白层析系统,是电脑软件自动画图

仔细看说明书,装好柱子就可以,缓冲液得看你蛋白稳定性,通常可以选择 pH7-8 20-50mM tris-HCl 缓冲液.看看实验书或者问问周围熟悉的人更快,其实对你的样品如果杂质都小于你蛋白,那也许选择 Sephacryl S-100HR 会更好。

我现在要做细菌的脂多糖的课题,想进行纯化(实验室没有超速离心机,所以想用层析的方法),但是它目前的分子量还没有报道,理论上应该是要大于 10KD,小于 100KD,请问我应该从哪几方面去选择填料?同时想请教一下有没有推荐使用的适合脂多糖纯化的填料?

最好查文献,依葫芦画瓢,可以选择离子交换和凝胶柱子

小弟有一个蛋白大约 60kDa,本想做个质谱,但是公司打电话来说没有信号,怀疑是盐浓度太高,想请教用何种方法脱盐比较好。(蛋白没有问题,我刚刚电泳过)

G25 除盐柱或者超滤离心管

非常感谢 chromatography 老师的解答,使我豁然开朗。我想再问个问题,凝胶层析中上样的样品有什么特别要求没有?如上样的量如何确定?浓度? pH 等。对结果会有什么影响?

别客气,凝胶层析中上样体积需要严格控制,pH要和平衡柱子的一致,控制上样体积就可以,浓度可以不考虑,但是太浓可以适当降低体积,这些不注意当然是影响分离效果,具体的注意事项多看实验书问周围熟悉的人,通常凝胶柱子的上样体积要小于5%柱床体积,除盐柱可以小于30%柱床体积

请教 chromatography, 关于胞内可溶性蛋白的纯化, 因为胞内杂蛋白很多, 一般按照什么路线纯化, 谢谢

如果有标签,那选择合适的填料和柱子就可以,如果没有,那就只能常规离子交换,疏水,凝胶柱子这些方法,最简单是查文献看这类蛋白怎么纯化.没固定思路,纯化需要试

老师,我想知道硫酸铵沉淀下来的蛋白,紧接着上疏水柱,一般最好用什么溶液溶解阿???

我最近一开始时直接用疏水层析的高盐溶液,溶解沉淀,发现离心后,上清很干净,不过有很多沉淀没有溶解,跑电泳发现有很多目的蛋白仍然在沉淀里面;于是我改用低盐溶液溶解硫酸铵沉淀下来的蛋白,发现几乎所有的蛋白都溶解了,问题也出来了,离心后,发现上清不澄清,这样直接上疏水是不可以的,我想既然离心里下不来,我就用过滤把,结果1.2微米的膜都过滤得很困难,很麻烦,怎么办呢??高盐溶液溶解会损失蛋白,低盐溶液溶解得太彻底,所有的东西几乎全溶解,结果样品不澄清阿

注意 pH,不同 pH 溶解度不同,所以测一下你样品的 pH,换几个 pH 也许能找到合适的能很好溶解,此外样品的浓度不能太浓,盐浓度也别太高,不澄清不能上柱子

chromatography 师兄,我是研一的学生,以前从来没有做过实验。我想做有关于铁蛋白种类的电泳,但首先应该从血清中分离铁蛋白,对吧?怎样分离呢?还有,分离出铁蛋白后,电泳的种类该具体怎么选择,比如选择怎样的缓冲液?我网上查了很久都没有什么进展。希望能得到你的指点

电泳和一些层析的实验参考<生化实验方法和技术>,此外查文献,可去图书馆查

请问 chromatography 老师,核蛋白怎么浓缩?常规的丙酮沉淀行不行?再溶性好不好?我是用的试剂盒提取的细胞亚结构,其蛋白含量很低,不够 IEF 的上样要求。另外还要膜蛋白怎么浓缩?我们已经做过冷冻抽干,但再溶性不是很好,请问有没有跟好的办法?因为蛋白来源不多,希望找到一个即能浓缩又损失少的办法,谢谢!

这个蛋白没做过,丙酮沉淀后是比较难溶解的,最好直接超滤或者透析后用 PEG 干粉浓缩,膜蛋白溶解需要加点表面活性剂.多看看相关文献最好

第一次做纯化的菜鸟想问问:我想从乳中提一种多肽,分子量6000左右,等电点4.6,有两个二硫键,我现在手头有一个 Sephadex G-75,我想超滤去除1万以上分子量的,然后过这个柱子,不知道可行吗。

Sephadex G-75 上限是8万,超滤后上这个柱子没意义,分不开,你可以选择离子交换,再配合分离上限更小的填料,可看看相关的书及文献

chromatography。我还想请教一下，一般是按什么顺序，先凝胶后离子，还是先离子，谢谢

离子处理量大,所以选择它做前面好,再过凝胶这样体积小分离效果好,没固定的模式,但是个人觉得是这样,如果样品有盐那倒是倒过来做

请问 chromatography 老师,我用双水相技术分离一环五肽物质,效果不错,可是脱盐遇到问题,因该物质分子量只有 600 多,盐为 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 构成的缓冲液,还有少量 PEG1000,请问该用什么方法脱盐啊,多谢!

也许只能用反相填料,没更好的方法,还可以稀释上离子柱,然后用碳酸氢铵或者甲酸铵洗脱,冷冻干燥就可以

你好,我是第一次到这个论坛,在试验方面也算是新手,我想问一下在上柱前需要了解蛋白的那些性质,要如何确定该上什么柱来进行纯化呢

这个问题太大了,如果我做,我需要了解等电点,分子量大小,稳定性,活性测定方法,溶解度,有没有抑制剂,有没有别的物质结合位点,有没有半胱氨酸等等,了解越多越好,新手最简单方法就是多看文献,然后模仿,再看实验书,上什么柱子当然也是按文献做,然后再修改,再就是多看蛋白纯化的书,看的越多越有好处,还要看看各家有关蛋白纯化公司的填料选择指南及说明书等,路漫漫.遗憾篇幅有限,难一一说明. [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下有填料选择指南及生物大分子纯化策略对你也许有帮助,此外在这个帖子中也列出了一些参考书:<蛋白纯化与实验鉴定指南>、《生物工程下游技术》、《酶工程》、《酶制剂工业》《生化实验方法和技术》,《蛋白纯化实验指南》,《生化制药学》,《药物蛋白质分离纯化技术》,《蛋白质纯化技术及应用》,《protein purification》等

chromatography 兄:上面看到有人问用 EDTA 处理过的镍柱有可能用来纯化含铜的金属蛋白。我要纯化的蛋白由两个亚基组成,分子量在 100k 左右,活性中心含镍铁,有可能用镍柱纯化吗?谢谢

应该是可以试试.理论上应该可以

chromatography 您好.我没做过蛋白纯化实验,但我想问下在纯化  $\beta$ -葡聚糖酶时为什么用醋酸做缓冲液(离子交换层析)?在蛋白纯化中一般很少用醋酸做缓冲液的.因为它偏酸而且缓冲能力不强.是不是因为  $\beta$ -葡聚糖酶的活性 pH 有关,其他还有原因吗.谢谢!!

也许是习惯不同,无所谓,通常缓冲液种类影响不大

chromatography 您好:我现在刚从事蛋白质的纯化工作,有许多问题不懂特向各位前辈请教。目前我要用亲和层析的方法从人血清中纯化 HBeAb—即 e 抗原的抗体,请问我应该选择哪种柱子?哪个公司可以提供?

先看文献选择什么,没做过,所以麻烦你说清楚点.如果有抗体,那直接偶联抗体去纯化,你只需要选择活化填料即可。

楼主你好，又来麻烦你了:) 现在纯化一个产物，分子量大概 5000，做 GPC 高压液相时发现产物峰后面还有个峰，分子量大概 2、3000，现在想 用分子筛分离纯化，S200 分离球蛋白的分子量范围是：5000~250000，分离葡聚糖的分子量范围是：1000~80000；G25 分离球蛋白的分子量范围是：1000~5000，分离葡聚糖的分子量范围是：100~5000。有人建议用分子量范围大的 S200，说这样峰在后面出来，分离效果会比 G25 好，我对此表示怀疑，不知道楼主是不是认同？

说实话如果是预装柱也许效果会好点,但是那也要选择分离范围越小越好,而 S200 肯定效果不会比 G25 好.但是我觉得 G25 更合适,你选择细颗粒,长柱子,少上样看看,也可以选择离子交换等去纯化,不一定非要过凝胶柱,因为分子量差不多很难分离,效果差,处理量小,不得已我通常不考虑凝胶柱子

我想你说的变性条件下上样是不可能离子柱上实现的。因为离子柱的纯化原理是低盐条件下吸附，再用高盐条件洗脱。你用尿素溶解（8M），这么高的盐，是不可能蛋白结合到离子柱上的，倒是可以用疏水柱来实现。当然，很多人利用载体自带的 6his-tag，用 Ni 柱来纯化变性蛋白。过柱大部分情况可以在室温条件进行，除非目的蛋白对温度有特殊要求。对于你这种情况更加不用担心温度的影响了。再补充一点，软件预测的 pI 可能与实际情况有很大差别，在用离子柱时要特别注意这一点

多谢回复,都很对,变性条件下凝胶柱子和离子柱子都不会有太好的效果,就得先复性再纯化.也可以选择柱上复性,多看看文献,其实 6 个组氨酸标签不一定影响活性,在包涵体里一样需要复性再往下做,难不如带标签,纯化后复性或者镍柱上复性的好

chromatography 您好.由于实验需要做蛋白纯化实验，我以前没做过这方面的。我要将一个样品材料中含的各种主分子量条带纯化，然后后期做将这些蛋白做免疫方面的实验。由于我的样品材料比较宝贵很难收集，实在不敢贸然进行实验，我想请问我最好用什么方法进行蛋白纯化呢？最好是选纯化的蛋白质量比较好且样品损失量最少的方法。

如果你的量这样少,而且要每部分都收集,难有什么好的办法,HPLC 制备是最可行的,何况只做免疫即使变性也没关系.但是你需要量大只能用常规方法,没什么好方法,都需要试,合计你要每部分都要,真的很难,不好做

chromatography 您好: 一个好困惑的问题，我用 CM-5 2 阳离子填料来纯化目的蛋白，但是有个现象却始终不得而解，希望高手能帮我分析分析： 我的蛋白在用柠檬酸缓冲液，pH 为 6.5，用 100-200，200-300，300-400，400-500 mM 线性洗脱，结果却出现了目的蛋白出现在各个洗脱峰里面，在 300-400 mM 线性梯度洗脱时第二条杂带被除掉了（主要是这条带，如果能解决，我的纯化应该可以走通了），我想知道的是：1. 我的目的蛋白为什么会出现在各个洗脱峰里？应该是一个蛋白不会出现在不同的洗脱峰里的，为什么会这样？2. 我想用阶梯洗脱重现该结果，但是却不能将第二条杂带分开，目的蛋白质和杂带居然在 200 mM 下被洗脱！为什么会这样？我该怎么解决？

1,因为线性洗脱很粗放不精确,何况你做线性洗脱这么散,当然效果不好,不如直接用 100-500

做时间长点的线性试试,或者直接用 100,200,300,400,500 做阶段洗脱的好,根据效果再精细到 50mM,这样效果也许更好.如果 200 就下来,那你可以做 50,100,150,200 阶段洗脱,如此类推,一直找到能把杂带和目标带分开为止

我困惑的只是,1 为什么目的蛋白会出现在各个洗脱峰里面, 2 我以 20 mM 为距离进行阶梯洗脱,结果主带与杂带也同时被下来了,并不能将上述的结果重现。3.线性洗脱的结果为什么与阶梯洗脱的结果差如此远?如果是这样,我怎样将结果重现并优化?补充: 我阶梯洗脱的程序如下,先用 300mM 进行洗脱,结果目的蛋白和杂带同时被洗下,后用 200mM 进行洗脱,结果还是如此,遂改用起始为 80mM,以 20mM 为间距进行洗脱,结果我洗到 260mM 也没有将目的蛋白洗脱出来,最好用 2NNaCl 将目的蛋白洗出。很显然如果是这样,那么意味着我的蛋白只能以线性来进行洗脱?

蛋白表面的电荷分布并不均匀,而且你洗脱的浓度未必是临界的浓度,所以在某个浓度附近有不少阶段或者线性洗脱峰中都有蛋白,此外离子柱子并非简单的离子作用,还存在别的作用力,例如疏水等干扰导致混合,所以出现这样的结果.但是这样极端的现象不常见,你重复不好也许你换新填料试试,你用的填料很老,可以选择琼脂糖凝胶的试试,我在实验中没遇到过,而且纤维素的填料也没怎么用,总之要做对比才能排除,此外还需要留意你蛋白的稳定性,如果蛋白沉淀就难洗,而且到处都有,总之你实验难重复也许和溶解度有很大关系,换缓冲体系或者改个 pH 试试,或者换阴柱试试

补充: 我阶梯洗脱的程序如下,先用 300mM 进行洗脱,结果目的蛋白和杂带同时被洗下,后用 200mM 进行洗脱,结果还是如此,遂改用起始为 80mM,以 20mM 为间距进行洗脱,结果我洗到 260mM 也没有将目的蛋白洗脱出来,最好用 2NNaCl 将目的蛋白洗出。很显然如果是这样,那么意味着我的蛋白只能以线性来进行洗脱?

线性洗脱重复性更差,你实验难重复还需要留意你蛋白是不是稳定,如果时间过长沉淀就是难洗下来.换填料或者还个 pH 或者用阴柱试试.或者用新的填料

我的蛋白也是用 CM 的,在 pH4.8 时出现了又穿又挂,而且穿透峰里面会有较好的除杂效果,但是挂上的蛋白也不再少数,计算收率,二者接近 50%,这样的收率显然是不能解决问题的,我的问题是: 1. 下一步的优化我该怎么做? 样品处理该怎么做? 我好担心会由于样品的原因出现不能变化。2. 我尝试将目的蛋白挂上后,进行很精细的阶梯洗脱,但是和上面 zxcg88 的结果一样,也是目的蛋白出现在各个洗脱峰里面,怎么办啊,怎么会这样啊?

如果这样,可以提高 pH 到 5-6,尽量让你目标蛋白挂不上,而杂蛋白挂上,然后再改变 pH 用阴柱试试,挂不上的部分也许是过载量.各个峰的问题在上面已经解释了.不在重复.一定要注意蛋白本身的稳定性,而且留意填料本身是不是没再生好

我是刚刚接触植物蛋白的提取,想求助.. 植物总蛋白的提取,伴随的色素问题怎么解决,开始我用过 PVP-40 但是色素被除去的同时黏度大大的增加,使得上离子交换柱无法洗脱.

可以稍微稀释一下样品再上柱子,这样不影响你的分离

那么如果上样前，对溶解样品进行透析，将尿素浓度降低，不知是否可行？在 DEAE 的说明书，我看到它可以耐受一定浓度的尿素，是否指将尿素控制一定浓度范围内，还是可以使用离子柱分离。另外，再请教一下，现在买来的新 DEAE 材料，从说明书看，似乎很好处理，但是我在丁香园里看到，要碱酸碱的洗涤，请问这个材料是怎么预处理的？

低点浓度也许会好点，你可以看看一些有关层析复性的文献，特别是有离子柱复性的，看他们怎么做的，总之离子强度大难吸附你的蛋白，透析后你蛋白也许会沉淀，所以多看看文献再做，填料本身耐受尿素是没问题，关键是挂不上就分离不了，两个概念。填料如果是 DEAE 琼脂糖凝胶不需要特别处理，装柱平衡就可以用了

蛋白浓度在 0.1ug/ml，应该选择什么填料，是 his 融合蛋白，想用 amersham 的 hitrip chelating hp，填料颗粒 34；如果用 ff，颗粒 90，该用哪种，是不是 90 大小的吸附少些？重来没有做过蛋白纯化，更不要说如此低浓度蛋白，有什么建议吗

都可以,颗粒小分离效果更好点,大的和小的载量没太大差别.但是你浓度太低,最好能浓缩或者先上离子柱,这样可以更好保护亲和柱子

chromatography 您好:最近做 CM FF,我的样品上样后,有一部分蛋白用不加盐的缓冲液洗时,就被洗脱下来了,还出现了两个峰,这是怎么会事呢,我觉得不与填料结合的蛋白应该一起下来的,虽然 CM 有一定分子筛的作用,蛋白前后两个峰的蛋白分子量几乎是一样的,请您帮我分析一下,先谢了

会不会柱子装的不匀,你再试试,如果还这样重新装柱子试试.不加盐洗下来当然正常

chromatography 老师，您好！我构建了一个九肽基因 4 串联体，进行原核表达，pBV220 作为表达载体，该载体温度诱导表达的是非融合蛋白，现在只知道表达蛋白的分子量为 6KD，其他性质都不知道，纯化后此串联体准备用溴化氰裂解为单体，测该九肽的抗病毒活性。抗病毒的机理是竞争多克隆抗体在病毒上的结合位点。请问怎样能纯化该蛋白呀？想用分子筛，但不知蛋白结构，不知能不能用。九肽序列为：CTLTKLYC，串联体是在每个九肽中依次有甲硫氨酸、丙氨酸、精氨酸、甲硫氨酸。您能帮帮我吗？我不知该怎样进行纯化。

仅用凝胶柱是难得到纯品的,多看看文献怎么纯化的,我想最好选择 HPLC 去制备最快.也可以先过离子柱子后上 HPLC 去制备

请教大家，我要从 SDS-PAGE 胶中纯化材料的蛋白条带，我从园中看到了比较多的从胶中纯化的办法，请问我用这种从 PAGE 胶中纯化的蛋白能用于 EILISA 检测吗？

应该可以

请问一下，Sephadex G25 和 Superdex 200 的柱料该如何清洗如何保养呢，可以重复利用多少次啊？另外像 PD-10 和 NAP-5 脱盐柱该怎么清洗呢，可以把柱料弄出来清洗了再自己装吗，那样的话效果是不是没有原装的好啊？

在柱子上用 0.5MNaOH 洗几个柱体积,水洗到中性保存在 20%乙醇中就可以.PD-10 和 NAP

-5 也可以一样处理,不需要把填料取出.效果当然是原装的好

再请教一下, 如果 PD-10 或者 NAP-5 中柱料 (Sephadex G25) 干了该怎么处理呢, 是不是就不能用了? 谢谢

取出重新溶胀装柱子就可以

楼主, 你好. 有个问题请教一下, 一般凝胶过滤除了可以分离成份外, 也起一个脱盐的作用. 但是为什么在很多的书上, 或者 protocol 上, 建议在凝胶过滤的 buffer 中加入一定浓度的盐离子, 说是为了消除凝胶颗粒的电荷效应, 而且根据我看到的资料, 离子的浓度还比较高, 大概都要达到 0.1MNaCl 以上. 这怎么解释呢?

因为有的时候 sephadex 上有一些离子作用, 因这样导致非特异吸附导致拖尾或者收率降低, 加盐可以消除这样作用力, 低浓度的盐影响不大, 所以 0.1MNaCl 不算什么, 这也和蛋白有关, 有的蛋白直接用缓冲液也可以

我的柱子过完蛋白样品, 并且洗脱后. 用水洗柱, 再用 20% 的乙醇保存在 4 度. 后来我发现蛋白可能还挂在柱子上没洗下来. 请问用 20% 的乙醇过柱会不会把本来没洗下来的蛋白质洗下来. 我还可不可以用原来这根柱子再用更大浓度的咪唑把我要的蛋白洗下来?

可以洗脱的时候用更高的咪唑浓度, 也可以同时减低 pH, 这样都可以使洗脱更彻底, 20% 的乙醇洗不了蛋白. 建议最好是再生柱子, 还可以取点填料加电泳缓冲液煮, 离心取上清跑电泳, 如没蛋白说明洗脱彻底, 如果有说明洗脱不完全.

层析兄你好, 我在试图纯化一个病毒. 其表面的蛋白, pI 我不是十分清楚, 估计应该在 5.x 吧. 我用了 DEAE Sepharose FF 和 Q Sepharose FF, 我的目的主要是想去年宿主细胞的 DNA. 我用的缓冲液 pH 为 7.5. 我查的文献一般该病毒应该在 0.2M NaCl 就可被洗脱, 但实际却需更高浓度, 达到 0.4-0.5M. 而此时 DNA 也洗下了. 原来我的想法是 DNA 是强酸, 应该不易被洗下的. 我应该怎么办 呢?

看什么病毒, 其实你可以加 DNA 酶, 这样病毒颗粒大, 直接走凝胶柱子就可以去掉 DNA, 再上离子柱浓缩也可以, 当然也可以先过离子柱子再上凝胶柱子

楼主你好 我刚开始接触实验, 很多东西都不懂, 我现在要从在液氮中冻存的脑组织中提取蛋白, 能告诉我具体的实验步骤和试剂吗?

请参考帖子中的书去看看, 具体的实验还是看看文献, 发一份填料选择指南和生物大分子分离纯化策略, 希望有帮助

你好: 我的两种蛋白大概 400Ku 和 160Ku, 想用 DEAE-纤维素 52 分离, 在不知道等电点的情况下, 如何选择平衡液的 pH 值呢? 如果不用此填料, 还有其他更好一些的填料吗? 我很困惑, 希望得到你的答复!

400Ku 是什么, 最好选择 DEAE 琼脂糖凝胶. 基本的实验可以参考文献或者实验书, 在本帖子中

有常用参考书,此外也可以选择凝胶过滤填料,还可以看文献有没有别的方法 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中有填料选择指南也许有帮助. 参考书:<蛋白纯化与实验鉴定指南>、《生物工程下游技术》、《酶工程》、《酶制剂工业》《生化实验方法和技 术》、《蛋白纯化实验指南》、《生化制药学》、《药物蛋白质分离纯化技术》、《蛋白质纯化技术及应用》、《protein purification》等

chromatography 兄,您好!我预用 26/40 的柱子装 G75 填料进行纯化我的目的蛋白(30K 左右),我的填料不多,大概能装 30cm 高,那么我洗脱时的流速在什么范围比较好呢.我的样品中主要含有一个六十几 K 的杂蛋白.由于第一次做凝胶过滤,所以还请您多多指教

30cm 高估计是太短了,难有什么好的分离效果,,最好换个 1.6CM 直径的柱子,这样填料就够了,应该能装差不多 60CM 高.不过你可以少上样品试试,不知道你多大的柱子,我想 0.5-1ml/min 应该差不多

chromatography 老师: 您好, 急问我的 G200 柱子流速非常慢, 柱长 70 厘米, 直径 1.5, 有什么解决办法吗

没办法,那填料太软,就这样的,要不就得换刚性更好的填料.如琼脂糖和葡聚糖混合做的刚性更好的 superdex 200 或者琼葡糖凝胶 G200

在下现在准备定量测定一个和人白蛋白 (HSA) 共价结合的多肽药物 (4 千多 D), 打算把和药物结合的白蛋白和没有结合的白蛋白分离出来以后, 再用 HPLC 或者 C/MS 检测, 我们已经制备了多抗, 不知能否使用类似亲和层析的方法进行分离? 或者其它方法, 能指点一二吗?

这个是比较复杂,只能试,因为你的抗体能结合白蛋白,而非特异只吸附修饰后的白蛋白,其实最简单的应该是用 HPLC 分离即可,反正抗体用处好象不大,除非 你的抗体只和你的多肽有亲和力.你可以先用染料亲和或者镍琼脂糖凝胶去纯化白蛋白和修饰后的白蛋白,或者你选择这两类高分辨率的填料看能不能分离,最简单 的还是直接用 HPLC 分离

你好,我遇到一个奇怪的问题:我想纯化的是可溶蛋白第一次纯化的时候蛋白在洗脱液 elute buffer 里(蛋白浓度高的几管里)出现了白色的絮状沉淀,跑了大胶准备割胶的,但是染色出来量不够,不知道什么原因,我又摇了一升菌准备再重复一次, 但是纯化时又在柱子的上方形成了白色的絮状物,柱子堵得根本过不下来,过柱之前我用了 12000 转离了 50 分钟,然后又用 0.45 微米的滤器过滤,我想不 应该是里面的渣滓太多的原因,请高手能帮我分析下原因吧

也许你蛋白容易聚集沉淀, 所以改变 p H 这样也许会好点, 还可以换个缓冲体系, 如果蛋白疏水性强或者有半胱氨酸容易聚合可以分别加表面活性剂和还原剂避免聚合增加溶解

我一共配了 5 种 Buffer,分别是 Charge Buffer, Binding Buffer, Wash Buffer, Elute Buffer, Strip Buffer, ph 都调到了 7.9,也想到可能是 ph 的问题,但不知如何调节,更多的师兄师姐都说他们的 ph7.9 都做的很好,可能我的 Buffer 配错了,于是我干脆用别人的 Buffer 重复了一次,结果跟上次一样,细胞是在 1\*Binding Buffer 里超声打碎的,然后离心取上清过柱子,样品在上清里面清澈透明挺好的,但是一加到柱子上方就出现很多白色絮状物,堵在柱床表面,样品滴的超 慢,差不多 1 分半左右一滴,等的急死人了,柱子也是用 1\*Binding Buffer 平衡好了的呀,

如果是 pH 的问题的话,为什么不上柱子时挺好,而加到柱子上就出问题呢,谢谢各位的指点!

你改个别的缓冲体系,或者你的柱子再生镍离子是不是没洗干净才导致沉淀呢,总之这样的问题是应该样品和平衡缓冲液不一致造成的

我要的蛋白由 BL21(DE3)pLysS 菌株表达, pLysS 表达 T7 溶菌酶, 看文献, 我作的纯化步骤是: 将离心收集到的 4ml 菌体沉淀用 200ul Buffer1 (20mM NaPO<sub>4</sub>, 0.5M NaCl,pH7.4) 重悬, -70 度冰冻再在 37 度溶化, 冰浴超声 4\*10sec, 11000rpm 10min 将包涵体离心下来。再将沉淀用 Buffer1+0.5% Triton X-100 洗两遍, 之后的沉淀用 Buffer2(20mM NaPO<sub>4</sub>, 0.5M NaCl, 6M 盐酸胍, pH7.4) 重悬, 冰浴超声 4\*10sec, 11000rpm 10min, 这样我认为所要的蛋白应该在上清中。我用 4ml 菌液做了表达, 发现洗到后面包涵体沉淀只有一点点, 按文献的表达量应该有 400ug 左右, 不知道我这样做是否正确? 包涵体的蛋白是不是损失了很多? 蛋白有 His 标签, 于是用 Ni 柱分离, 分离步骤为: NiSO<sub>4</sub> 上柱后, 先用 5ml Buffer2 平衡, 再将样品上柱, 用 25ml Buffer2 洗涤, 再用 25ml Buffer3 (20mM NaPO<sub>4</sub>, 0.5M NaCl, pH7.4) 让蛋白重折叠, 之后就用 25ml Buffer4 (20mM NaPO<sub>4</sub>, 0.5M NaCl, 0.5M 咪唑, pH7.4) 进行洗脱, 每 1ml 进行收集。所有的流速为 1ml/min。然后我用洗脱液做对照, 在 280nm 下测紫外, 发现收集到的级分吸收值都是负值, 这样我也不知道蛋白在那个级分里面, 请问这样我该怎么办? 收集的级分能不能直接上 SDS-PAGE 跑电泳?

4ml 菌体沉淀太少了, 何况要是只有 400ug 很难纯化, 建议多做点, 否则纯化不出只会浪费时间。还留意破碎上清看看有没有你的目标蛋白。镍柱纯化需要在变性条件下做, 你直接用 25ml Buffer2 洗涤, 再用 25ml Buffer3 (20mM NaPO<sub>4</sub>, 0.5M NaCl, pH7.4) 让蛋白重折叠, 之后就用 25ml Buffer4 (20mM NaPO<sub>4</sub>, 0.5M NaCl, 0.5M 咪唑, pH7.4) 不一定就能很好复性, 还是先纯化看看有没有目标蛋白再做柱上复性, 建议多看看柱上复性的文献, 没那么简单, 以你的蛋白量估计没什么东西, 跑电泳也不一定能有, 但是你可以试试吧, 没有的话就多发酵点样品再做

谢谢回复, 那一般纯化需要培养多少 ml 菌? 文献上摸索成熟了就直接用 100ml 摇菌, 现在我只想尝试一下, 于是只用了 4ml 培养。先纯化看看有没有目标蛋白是不是我将包涵体裂解后直接跑 PAGE 看有没有目标条带? 洗脱后的样品中含有咪唑, 我能不能直接跑 PAGE? 会不会有影响? 好像只有盐酸胍对跑胶有影响

对,破碎后直接用上清和沉淀跑电泳或者直接取菌体加电泳缓冲液煮后跑电泳,首先确定表达没问题再网下做,有咪唑不影响电泳,但是盐酸胍有影响需要去除,也可以用尿素代替

楼主好, 请问一个装柱的问题: 我的柱子是 1.6\*80 的, 准备装 60-70 高, 凝胶是新的, 抽滤, 用去离子水和 buffer 分别洗涤了若干次, 泡在 buffer 里, 开始灌注。按照说明书推荐的方法, 一个是用泵灌, 我们这里没有条件, 还有一个就是直接灌, 但是 amersham 一般是有个接头把两个柱子接在一起, 所以能够把填料一次性灌入, 但我们这里做不到这样。也就是说无法像它说明书说的, 一次连续性的将凝胶灌入, 只能是灌一些, 待沉降一段后, 再搅混柱内凝胶表面, 再加灌, 如此反复若干次。我感觉这样是否容易造成凝胶分层? 不均匀? 在这样一种条件下, 如何灌柱比较合适?

没装柱器也可以, 把填料沉淀上的水去掉一些, 差不多水只有总体积的 1 / 4 左右时候混匀

一次装柱，同时别把柱子下口打开，等填料完全沉淀接上泵走压好柱子固定好转换头即可

色谱您好：我的蛋白在 sds 上显示单一条带，我想知道蛋白的结构，请问是否可以拿去做质谱？从胶上切下条带去做质谱可以么？

如果只有一条带，那你本身留有的样品直接去做质谱就可以，没必要一定切胶，当然你要这样做也可以。你最好咨询做质谱的人有关样品处理的问题。

再请问做质谱需要多少蛋白样品量，如果从 SDS 上切胶下来的够么，还是需要富集或者复性之类的处理？

你需要问给你做质谱的人需要多少量，切胶的部分不能染色，复性应该没必要，是不是要浓缩你也需要问做质谱的人，他们对样品要求更有经验

我的蛋白在 sds 上显示单一条带，我想知道蛋白的结构，请问是否可以拿去做质谱？从胶上切下条带去做质谱可以么？请帮帮忙。

如果只有一条带，那你本身留有的样品直接去做质谱就可以，没必要一定切胶，当然你要这样做也可以，只是需要把染料洗掉，你发外面问问：)

lz 好，我是个蛋白纯化的新手，在做原核表达及纯化的时候遇到了一些问题，想请您帮我分析下，万分感谢！蛋白表达：我的目的蛋白约 100KD，选用的是 pGEX-4T3 质粒载体，构建成功后，双酶切、测序验证质粒的序列正确。在 BL21 (DE3) 菌种表达，我在 25、32、37 度做了温度梯度，5、16、20、24 小时时间梯度，超声裂菌后分别用诱导前、诱导后、超声作用后菌体裂解液离心后的上清、沉淀跑了 SDS-PAGE，因为在我的目的带附近条带比较多，我的胶跑出来感觉肉眼分辨不清有没有表达，我就想，用 promega 的 MagneGST(TM) Protein Purification System 进行纯化，分离出我的目的蛋白，以便观察，结果纯化不出蛋白。由于我的目的蛋白肉眼观察不便，我就考虑用另一组荧光蛋白 (EGFP) 来做纯化，分析是纯化过程的问题还是标底过程的问题。我的荧光肉眼就可以看到，而且比较强，荧光显微镜下验证荧光在菌体及裂解上清中均可在紫外下激发，来做纯化，目的蛋白与磁珠结合一步后，于磁力架吸附磁珠后，上清中的荧光还是很强，而纯化的到的蛋白浓度不高。还有，我在做的过程中发现，我提质粒的浓度有点低，大概在 170ug/ml，会不会是质粒浓度偏低造成的蛋白表达低？还有我在做转化的时候，涂板后，转化的细菌长的有点慢，孵育时间在 18h 左右才发现有满意的单个菌，挑菌。挑菌后我一般用 8ml LB 培养基培养，过夜后 1:5，5:25 发大到约 30ml，开始加 IPTG 诱导表达，表达后取 10ml 做纯化。我现在比较困惑，是蛋白没有表达，还是我在纯化过程中的问题致使纯化蛋白浓度偏低，还是我在这两步都做的不好？我的描述很简单，那里不清楚我再补充

如果蛋白的浓度太低的话，样品直接和磁珠混合难吸附很好，最好还是选择过柱子的方法，此外你也可以把吸附而且清洗后的磁珠直接取点加电泳缓冲液煮后离心用上清跑电泳看看。是不是表达你可以把诱导前和诱导后的菌直接加电泳缓冲液煮后离心用上清跑电泳看看，找出多余的带在你分子量附近就说明表达，如果没有就没表达

chromatography,您好，我现在用 Ni 柱纯化 his 蛋白，想做柱上复性，遇到的问题如下。收集

各步洗涤的溶液，检测结果发现在蛋白加到柱子上以后就很多蛋白没有结合就流了下来，第一次洗涤溶液中蛋白量也不少，之后的几次洗涤液中蛋白含量微或无（因为想做柱上复性，在洗脱前做梯度洗涤），洗脱液中基本无蛋白或者微量蛋白。问题就是：his 蛋白不能与 Ni 柱结合的可能原因？解决办法？另外，对于柱上复性，您有什么好的建议么？

首先需要可以选择配基密度高的填料,提高 pH 到 8.5,延长作用时间,提高加大上样量,如果现在用的是尿素,可以改用盐酸胍溶解样品,如果有不少二硫键可以加 1-2mM 巯基乙醇,变性更彻底,这样吸附会更好,柱上复性做的不多,你可以多看看文献,复性也不是简单的事情,只能多试试

问一个比较简单的问题：我一直过分子筛 sephadex G50，采用 PH7.8 的 Tris-HCl，0.9%NaCl 缓冲液洗脱，去除抗体中几百 D 分子量的小分子物质，分离效果很好。现在想用水洗脱纯化，不知道能否有效分离去除小分子杂质？有没有什么不良影响？抗体在水中长期保存，与 tris 缓冲液相比稳定性会很差吗？这个实验我下周会做一下，但是现在急于想知道结果，有无做过这个实验，或者能够从理论上阐明可行性的战友给出一可靠回答？

最好别用水,因为水中蛋白溶解不好,而且没缓冲能力,此外不加一些盐 sephadex 类柱子会有点拖尾,按你的实验选择 G25 更好,因为刚性好流速也快.当然你也可以用水试试,如果没问题那也可以

chromatography,您好，我用镍柱纯化可溶重组蛋白，切割后目的蛋白发现有部分挂柱，部分不挂柱。挂柱蛋白用 0.1M 咪唑洗不下，用 0.3M 咪唑与标签一起洗下。我的蛋白有 3 对二硫键，请问是否是游离半胱氨酸残基结合亲和柱，而形成完整二硫键蛋白穿出？

我觉得不是因为二硫键的问题,挂柱也许另有原因,要注意样品中需要加 0.3-0.5M NaCl,这样可以避免因为离子作用而被吸附.或者那挂柱的蛋白没切彻底呢,你可以直接把目标蛋白吸附在柱子上,然后酶切,再冲切后蛋白,这样也许更好点

请问一下：我做的多糖，用的 sephadexG-200 上样量 18mg 上样量 5ml 柱子是 1.6\*70 的，但是感觉很粘，一会柱子上面断了，不知道是因为什么？是浓度太大了还是太柱子没灌好？

这个填料的刚性很差,压力和盐都会使柱体积压缩,颗粒变小而流不动,你样品不能太浓,流速不能快,要不就换刚性好的琼脂糖和葡聚糖凝胶混合的凝胶填料

再问一下：凝胶柱子堵住后，怎么知道是堵住了？是洗不下来东西吗？怎么可以再生？怎么处理？

堵住了当然是流不动,如果洗不下东西那只要不沉淀就不会堵的,你用的填料是因为填料变性压缩流不动,严格说和堵柱子还不大一样.只能取出填料,这样稀释了你的样品,没压力,它就回来,重新装后缓冲液洗干净,如果是刚性好的填料通常不出现这样因为填料压缩而流不动的问题

有个问题，想您给点建议，我们在纯化一种膜蛋白，属于酶，直接从生物体内提取。在提取过程中加了 Triton X-100 助溶。利用分子筛与 DEAE-Sepharose FF 进行纯化。先过分子筛

时,洗脱峰酶活性很高,但将酶活峰接着过 DEAE-Sepharose FF 时,使用盐线性浓度梯度进行洗脱,结果酶活性峰比活等很差,在柱上也出现了沉淀情况。缓冲体系以及洗脱液中均含有 0.5 的 Triton , 整个洗脱过程中浓度未变。Buffer pH=7.4。我们做过实验如果洗脱体系中不用 Triton, 那么, 经过离子柱的洗脱峰收集不到活性峰。现在存在问题: 如何改进离子交换洗脱或者其他条件, 使其活性提高。一个想法是同时增加 Triton 与盐的浓度进行洗脱, 不知是否可行?

怀疑还有蛋白没洗下来,加大盐浓度或者降低 pH,降低吸附力试试

你好: 我要用分离的样品中主要有 2 种物质, 一种 pI 值大概为 5—6, 量少; 另外一种 pI 值大概为 7—7.5, 量大, 想选用 DEAE 纤维素 52 分离, 不知道组氨酸缓冲液和 Tris 那一种缓冲液更好。

阴柱选择 Tris 即可.你可以把 pH 调到 7 左右,这样也许前者吸附,后者穿透即可,总之你可以多试 7 附近的 pH 试试,应该有一个值能达到这样的效果.此外最好选择 DEAE 琼脂糖凝胶,不推荐用纤维素的,因为难在柱子上清洗,而且流速慢.操作麻烦

chromatography 您好! 我个问题想要请教, 我的蛋白带有 his-tag 序列, 等电点 PI=7.0, 培养了 3 升菌体, IPTG1mM 诱导 4 小时, 蛋白在包涵体中, 用 70ml 含 8mol urea 的 pH7.4bufferA 溶解, 第一次上镍柱时我用线性洗脱, 在 bufferB 为 30%时只有一个洗脱峰, 电泳发现挂上的蛋白很杂, 目的蛋白只有很少的条带, 即去除了很多杂蛋白, 绝大部分目的蛋白都没有挂上, 后来过阴离子柱, buffer 用 Tris.HCl 配制, pH8.0, 线性洗脱, 有一个小峰, 电泳发现挂上去的蛋白和上样流出差别不大, 挂不上去是不是因为我的蛋白浓度太稀了? 另外, 我超声裂解细菌时, 可能菌体过多, 没有超好, 会不会导致蛋白特别杂或其他的不好影响? 我又将蛋白用不含尿素的缓冲液透析, 蛋白沉淀后用 5ml 盐酸胍溶解液全融了, 下一步我该怎么做? 可不可以给些建议?

带标签最好用亲和,怀疑只有 30%的洗脱难把蛋白洗下来,同时可以把样品用盐酸胍溶解再上柱子试试,尿素变性也不如盐酸胍完全,所以标签暴露不好也许挂不上也有可能,多看说明书,再重新做,建议现在阶段洗脱的方法,可参考 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中镍琼脂糖凝胶的阶段洗脱方法

chromatography 兄, 您好: 我最近用 G 7 5 填料(柱子型号为 1 6 / 1 0 0)纯化我的蛋白, 我柱子装约 7 0 cm 高, 流速 为 0 . 4 ml / min, 我上样量为 3 ml, 而且我的蛋白浓度不大. 但是, 我过了好几次, 都没有将我的目的蛋白(约 3 0 K D)与杂蛋白分开(杂蛋白为 6 0 几 K), 电泳检测它们总是在同一个峰里下来. 你帮我分析一下, 到底原因出在哪里呢, 是不是我的条件设置不对呀? 先谢了, 老板现在催得急, 我真不知道该怎么办了

30KD 会不会形成聚合体呢,你上样体积是多少,,此外即使分子量差别大有时候凝胶柱子也未必都能分开,还可以试试离子柱等.你也可以换高分辨率的填料试试

谢谢 chromatography 兄这么快就回复.我上样体积有 3ml 也上过 4ml,我现在的样品就是以前过离子柱收到的.我的目的蛋白是一种低分子量脂蛋白,不知道是不是形成了聚合体,我怎样才能检测到它形成了聚合体呢?如果要换其他填料,哪种比较好?

此外你的蛋白会不会和你的杂蛋白形成复合体,这都是比较难说的,你可以仔细摸摸离子柱子的条件看能不能分开,也可以试试疏水如苯基琼脂糖凝胶,因为脂蛋白应该疏水性强,实验只能去试,有时候很难说哪个更好,需要仔细摸纯化的条件

谢谢你前面给我的建议,我现在已经把我的 sephacryl-200 柱子装好,正在平衡中,在处理样品的时候,突然发现了一个问题。我的样品是用 8M 尿素溶解的,我的计划是在上柱前,进行透析,将尿素浓度降到 2M,但是这样一样,是否需要在低温条件下过柱?因为尿素浓度的降低,会启动蛋白质的复性过程。但是我们目前没有低温过柱的条件。。。另外,如果直接 8M 尿素上样,我觉得容易导致蛋白质沉淀在柱子上,再就是前面有帖子提到过,变性的蛋白质,分子筛效果不好。请教一下你的意见

那你先复性成功后再上柱子看看.复性后体积太大,我觉得最好还是先上离子柱子,再过凝胶柱子,这样才好

chromatography 你好!! 初次做层析,向你请教几个问题, 1 用 DEAE-Sephadex-A50 做层析时,最适上样量为多少啊?(浓度和体积)。2 溶胀 DEAE-Sephadex-A50 时,错用了 PH5.5 的醋酸缓冲液溶,请问,我想用 PH=7 的磷酸缓冲液过柱,现在该如何处理我的溶胶? 3 请问 WHATMAN 的 CM52 阳离子交换剂,用前如何处理才能灌柱?

填料太老,最好选择 DEAE 琼脂糖凝胶,因为 DEAE-Sephadex-A50 有盐和压力等柱床体积会压缩,流速慢,不能在位清洗等缺点,现在用的不会太多,上样通常可以按 10-20mg/ml 填料计算,浓度无所谓,但是也别太浓容易沉淀。2 不需要特别处理,直接用你需要缓冲液平衡到和缓冲液 pH 一致就可以,3 参考说明书,这填料也老,我都没怎么用,简单的就是直接溶胀装柱平衡就可以用。纤维素的填料一样有上面说的缺点,也用的少

1. 上样通常可以按 10-20mg/ml 填料计算-----那一个 30\*2 的柱子上样多少 ML 合适啊? 不同规格的柱子如何把握上样体积啊。2. 我看书说,蛋白浓缩可以在 4 度将透析袋埋入 SephadexG-100 或 G-200 树脂中,请问这样浓缩行吗? 会不会污染蛋白样品, SephadexG-100 或 G-200 指的是干粉吧?

1,你可以直接把水倒到那个高度,再倒出来测量体积就知道,不明白 30\*2 是什么柱子,是直径为 2,柱子长是 30 厘米吗,柱子的截面积乘长度就是毫升,单位都用厘米。2,是用干粉,填料干净的就没问题

色谱兄: 以前向你请教过问题,现在还要麻烦你了~,我一直在做的蛋白,经过离子交换和疏水层析“Butyl-Sephrose” (20mM PB 洗脱目的蛋白)后,在目的蛋白带(85KD)下,总是出现 1~2 条小带。其中 HIC 步骤中,目的蛋白表现出疏水性极强,用水依然能够洗脱出一部分目的蛋白。而且在水洗峰中,小带比 PB 洗脱峰含量高。以前怀疑是酶切的缘故,尝试了低温快速纯化,但是没有效果。现在怀疑是蛋白的疏水性太强,导致蛋白有断裂。把 HIC 的 PB 洗脱峰跑 SDS-PAGE 和非还原电泳,结果显示: 1.SDS-PAGE 目的蛋白下有小带。2.而非还原电泳目的蛋白下没有小带,且从条带粗细来看,目的蛋白相比之 SDS-PAGE 要细了将近一倍,也就是说看上去蛋白量少了一半。不知道这是什么原因,个人认为如果这个现象解释清楚了,就能够把纯化问题解决了。

从你描述的情况看来杂带的疏水性比你目标蛋白的强,我觉得你可以用 PB 做阶段洗脱,如 50mM,30mM, 20mM,10mM 5mM,0mM 分别洗脱收集洗脱峰做电泳看看.越是最后越要精细,纯化其实就是细致的活.电泳的事情我不很了解,不好下结论,我个人觉得也许杂蛋白和你目标蛋白分子量一致,但是有二硫键,所以非还原的一样,但是还原电泳就有杂带

请问一下用以 Fc 为标签蛋白,可以在不形成融合蛋白的情况下挂柱做 Pull Down 么? 还是必须的构建融合蛋白? 可以不挂柱,通过离心分离捕获的目标蛋白,就像 GST pull down 一样么?

抱歉,没做过 GST pull down,Fc 为标签蛋白也算融合蛋白,所以你需要用重组蛋白 A 琼脂糖凝胶吸附这样带 Fc 为标签蛋白,然后在和你蛋白混合,除填料不一样,其他的操作应该差不多

chromatography 兄: 问几个关于阴离子柱层析的问题,我目前在分离一个细菌内的蛋白,天然的,未知.参考同类蛋白的特性,pI 都在 6.5 左右,我选择了 pH7.5 的 Tris 体系,破碎超离后,直接上柱,DEAE-sepharose FF, 36/20 柱子,分辨率和得率还有重复性都很好,但是我发现杂蛋白比目的蛋白吸附能力强,穿透很多,但是光收集穿透部分的话,分辨率降低很多.目的蛋白相对稳定,但是比较怕氧气,所以为了能完成整个纯化流程,必须在第一柱 DEAE-sepharose ff 中获得较多样品,才能完成后面的层析流程.难道我要连续过很多次相同的柱子? 不想装太大的柱子,操作很麻烦.对于阴离子柱来说,是不是 pH 值越高,带电越强? 我换成 8.0 的 pH 对提高目的蛋白在 FF 中的吸收有没有帮助?

如果这样,最好是降低 pH,让杂蛋白吸附而目标蛋白穿透即可,也可以在样品和平衡缓冲液中盐浓度增加达到这个目的,提高点 pH 或者降低盐浓度应该能挂的更多,但是杂蛋白量大,占据位点那么提高也未必改善吸附量

十分感谢这个专题.请教一下,对于新表达出来的,未纯化的蛋白你选择以及制备填料时首先考虑的是什么? 对于这样的蛋白,其特性并未了解清楚,进行层析纯化的前提是可溶,而是否可溶的关键似乎是缓冲体系,这一对关系如何统一起来?

这个问题太大,通常我考虑的是尽量选择蛋白的特异性,也就是和别的蛋白不一样的特性去选择特异亲和的填料,如果没有也可以看看疏水性,结构等和别的蛋白不一样的特性,然后选择合适的填料,实在没办法再选择离子柱或凝胶柱子,而不是先考虑常规方法,当然参考文献最快.填料合成我们是尽量要合成最多的种类,最好的填料,熟悉填料和工具才能更好的选择,填料太少就没办法.至于不可溶那需要复性,总之你的问题没办法一一回答,请参考帖子里的参考书去看看,此外可以 参考一些公司的填料选择指南及纯化策略等, [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中有一些,希望有所帮助.纯化更多的还需要经验和尝试,所以抱歉难一下回答你的问题

chromatography 兄,我最近纯化一蛋白,分子量 38kd,电泳图显示在目标蛋白的下方,分子量约 22kd 及 18kd (或更小)分别有一杂带(怀疑这两条带为降解,因为纯化后立即电泳为一条带,但 4 度或负 20 度放置后,哪怕过夜,再电泳就会出现这两条杂带),分子量约 76kd 处也有一杂带(可以肯定是二聚体)。我用的缓冲液 pH 为 9.0 (纯化过程中我必须用 pH9.0 的缓冲液),是否在这么高的 pH 条件下蛋白发生降解? 有什么方法可以防止此降解? 或是否有保护剂可以保护蛋白免于降解?

那你可以冻干或者加一些保护剂,如果甘油,PEG,金属离子,盐浓度等条件自己摸索,配合电泳检测看看改变 PH 或者别的因素提高稳定性,曾经见过这样蛋白,提高盐浓度就可以抑制分解,如果本身是酶也可以加一些酶抑制剂或者 EDTA 等,只能自己去摸索了

接上: 质谱只打出 38kd、二聚体及双电荷的分子量,但没有我所认为的电泳图谱上显示的 22kd 与 18kd 的分子量。多谢了!

也许量太少或者别的原因,你自己排除,多做几次电泳看看,也可以做质谱提高点浓度等试试,抱歉,后续的工作我也不很熟悉,只能多看书,自己去摸索

请教 chromatography:我在用 Amylose resin 纯化目的蛋白时,用平衡 buffer 洗平后,用不同浓度的麦芽糖洗脱目的蛋白,目的蛋白在 1mM 麦芽糖中就被洗脱下来,仍然有少量杂带.我想参照 Ni resin 的方法,在用麦芽糖洗脱前用 pH5 左右的醋酸溶液洗 3-5 个柱体积,不知是否可行

应该不大相同,我觉得你可以用更低浓度的做阶段洗脱如 0.2mM,0.5mM 1mM 试试,此外注意破碎要温和,然后尽快纯化,否则降解或断裂杂带难去

chromatography 兄,您好!我是刚开始做科研,我想研究一下动物组织中的多肽,我想请你帮我看看我的实验方案怎么啊?我先把动物组织匀浆之后,冻融,低温高速离心去上清液,然后过 50KD 的超滤膜得到粗多肽液体,然后过色谱柱分离多肽测活性.我想问一下提取多肽的主要方法是什么?麻烦您对我的实验方案多指点

实验需要边做边摸索,方案很难说,你可以先按你的去做试试,有问题再讨论,提取多肽和蛋白的一样,所以多看实验书和文献就可以,特别是有关动物组织蛋白提取的方法

chromatography 兄:

原则上电泳能见到的条带,在质谱上能检测到。我是想做成冻干粉,但在冻干前须经脱盐,否则盐多了冻干粉会踏馅,蛋白在冻干过程中也会变性;我也考虑过加甘油降低蛋白的疏水性,但高浓度的甘油降低样品的熔点,低浓度的甘油我担心达不到效果(具体试验没试)。至于加 peg,我也正想做那方面的试验。我的蛋白不是酶,因此没有考虑过加抑制剂。同时,我还想设法降低纯化中的 ph,看能否达到现在的效果。做这个蛋白我都闷死了。不知你还有其他高见

我也没什么高见,你只能配合电泳来观察你蛋白的稳定性,改变我说的那些条件对比看能不能抑制降解,此外有的时候冷冻冰晶也会导致一些脆弱蛋白变性,所以高浓度甘油可以避免有冰在 20 度会不会好点,我觉得你只能自己多个因素去考察,我说的那个蛋白用的是高浓度的硫酸铵,应该 2-3M 吧.只记得有这么个事,具体的浓度我也没问

chromatography 兄: 2-3M 硫酸铵不利于我后续的冻干,我先按你上述的方法试试,如有问题,再次请教。

我只说了一些影响的因素,没十全十美的方法,我想还是稳定性要紧

chromatography 兄: 我的蛋白做变复性, 复性中加入 0.5M L-Arg, 想用 Ni 亲和柱进一步浓缩纯化, 上样后发现 Ni 离子颜色变浅, 其它成分没影响, 请问怎么回事?

只要不是没颜色就应该没问题,也许有的东西会改变颜色,你可以先不管,做下去有问题再说

chromatography 兄: 目的蛋白在 2M 硫酸铵的盐浓度下, 依然挂不上 phenyl 6 FF, 那是不是疏水性更弱的烷基疏水填料就更挂不上了? 比如 octyl 或 butyl

可以继续提高盐浓度,相对而言 octyl 比 phenyl 略强点,你也可以选择高取代的 phenyl, butyl 最弱,估计是更难挂

chromatography 兄: 我刚开始接触色谱纯化实验, 请您帮我解答以下几个问题, 谢谢。1. 磷酸纤维素柱填料 P-11 (Whatman, England) 在购买后, 容不容易保存? 应该怎样保存? 2. 我查的许多文献都是用 2.5\*5cm 的磷酸纤维素柱进行纯化蛋白的, 请问是自己定制玻璃柱和填料, 然后自己装柱吗? 装柱对于一个初学者来说是不是很难? 再者, 有没有现成的柱子可买? 3. 通常买进口填料的时候都要等一个多月?

抱歉,没怎么用过纤维素填料,太老了,保存应该容易,看说明书操作也可以问公司的人.装柱很简单,特别是离子柱,你肯定需要自己买柱子和填料,因为这样填料没预装好的,你用的填料我不清楚,问代理公司吧。理论上磷酸纤维素可以用 SP 琼脂糖凝胶代替,更好用,你也可以考虑

我现在装了一根 1.6\*20 的 DEAE, 摸一下分离的条件。我的蛋白 PI 预测是 6.3, 我选用的容易 pH 是 8.0 的, 准备线性洗脱摸索洗脱的 NaCl 浓度。因为以前没有做过线性洗脱, 所以想问一下, 如何根据线性洗脱的结果, 来判断我的适合的 NaCl 洗脱浓度?

即使线性洗脱,也还是需要用阶段洗脱的方法来找具体的浓度,所以建议还是直接用阶段洗脱的好.你也可以根据你开始的浓度到最后的浓度差,按你的出峰对应的位置计算就可以,例如线性 0-2M 假如你出峰尖位置在线性上的一半,那可以在 1M 附近, 同样道理如果在 1 / 3 处那差不多是 0.7M.这样不会很准确的, 还需要仔细摸索, 何况只要你不是线性 梯度那误差就更大

我的样品是肽, 样品都 <5kD, 里面含有很多的糖类, 请问怎么去除呢

如果糖没电荷, 可以先过离子交换柱子, 大多糖不给吸附, 也可以过反相柱, 糖难被吸附, 如果量大也可以用不同浓度的乙醇沉淀糖去除一些. 你样品的具体分子量最好是选择质谱去做

chromatography 兄:在座酶蛋白纯化的时候, 使用 DEAE-sepharose FF 进行。但洗脱峰活性很低。因为是膜蛋白, 因此在整个体系中都存在 0.5%左右的 Triton X-100。如果不加入 Triton, 洗脱峰里连一点活性都没有。想不到好的办法解决这个问题。

我觉得也许膜蛋白沉淀或者吸附在柱子上, 不用 Triton 洗不下来或者不溶解, 你可以提高它的浓度或者用点乙醇降低疏水作用试试, 也可以选择乙二醇, 此外配合电泳证明洗脱是不是

有你的东西，如果没有，当然没活性

chromatography 兄：我在清洗使用完毕的疏水填料 octyl 4 FF 的时候，按照说明书使用 0.5M 的 NaOH,我闻到加了碱进去后，填料散发出类似于尿素的味道，一点点味道，凑近闻才发现，正常吗？我在过柱时是没有用到尿素的。担心填料出问题了

应该没问题.再用试试就知道了

chromatography 兄。哦，我想了想，应该是过柱完的缓冲液中的硫酸铵遇碱产生氨水，挥发出来的味道。

硫酸铵遇碱产生氨水没错，所以先用水清洗再用碱，换个溶液最好都用水过度，如果有别的金属离子和碱可能沉淀那就容易堵柱子

chromatography：你好,我现在准备做两种偶联抗原的纯化,一种是牛血清白蛋白(BSA)偶联上一种农药小分子,因为偶联反应时肯定有 BSA 残留,还有其他杂质,我想问下我该怎么纯化出我想要的这种物质(BSA-农药小分子)呢?具体如何操作呢?另一种是卵清蛋白(OVA)偶联同上农药小分子.要求也同上

只能用除盐柱等去掉小分子,你可以让小分子的过量,至于偶连的蛋白和没连的蛋白也许难分离

chromatography,你好，还是那个问题，我如果用葡聚糖凝胶 G-25 过柱，pbs 做洗脱剂，pbs 会留在柱子里，还是一起留下来？如果一起洗下来，我应该怎么处理，能去掉 PBS 的盐成分呢？因为我想尽量得到纯点的蛋白

真的,只能去小分子,难把蛋白偶联和未偶联的分开,当然你也可以用 1 米左右的柱子试试.最好是选择颗粒细的填料,而且不能用 G-25.如果你不想有盐,可以直接用 pB 缓冲液平衡柱子,上样后也用这个缓冲液冲就可以,过 G-25,如果用 pbs 平衡和冲柱子,当然它也会流出来

chromatography:您好 我是一个蛋白纯化新手,最近正在纯化一个 6his 标签的蛋白(pet-28a) 遇到一个问题,做咪唑梯度洗脱时,发现蛋白在 180mM 时候就完全洗下来了, 60 180 有两个峰, 纯化效果一般 80%, 请问有什么方法可以优化呢?

你可以多做几个浓度,如 60,80,100,200mM 这几个咪唑浓度做阶段洗脱,收集后跑电泳,这样应该有更好的结果

楼主,我是一个新手,现在主要做一种交 a-半乳糖苷酶的蛋白的纯化工作,还不知道怎么纯化,也不知道要买什么东西,请楼主帮忙指点,给我点思路哦

没做过,最好是先去查文献,能用亲和就用亲和,没别的办法就选择常规的方法

楼主您好:我是一个刚开始做离子层析纯化蛋白的,想向您请教:离子柱才转型该怎么转啊?如果我想把醋酸根型阴离子柱转换成氯离子型,该用哪种溶液?溶液浓度如何?谢谢

用 Tris-HCl 缓冲液就可以.浓度 10-50mM 即可

chromatography 兄, 请教一些怪事, 我纯化一个未知的天然蛋白, 路线是 DEAE-sepharose FF, TSK M 650, octyl 4 FF, 第一柱和第二柱都是阴离子交换, 第一柱收集穿透峰, 无需脱盐正好上第二柱, 线性洗脱收集后加硫酸铵上疏水。前面两根柱子的条件都做得很好, 电泳后目的蛋白纯度在 50%左右, 还有两条杂带需要去除。因为我的样品来之不易, 我先用粗酶液, 而不是过完两根柱后的样品摸索疏水柱的情况。粗酶液调节到 1M, 目的蛋白可以挂上 octyl, 电泳后比较纯化样品, 似乎可以去除杂带。然后我拿过了两根柱的样品, 调节硫酸铵到 1M, 全部挂不上, 为什么? 我调节浓度时, 怕直接加粉末会有影响, 先配 3M 硫酸铵的缓冲液, 以溶液调的。

只能提高浓度,或者选择苯基这样疏水更强的填料,这样盐浓度就可以低,此外看看文献能不能用亲和的方法.1M 太低了

只有不到1毫克得样品了,结果电泳发现在 16500MARK 下方还有一杂带,怎么办? 继续过? 担心样品量太少, 回收不到东西

没办法,所以纯化尽量别做太少样品,只能再做了

求助: 我是一在读研究生, 所做课题难点在蛋白纯化, 所用方法是亲和层析, 目的质粒转入 293 细胞之后, 蛋白分泌至上清, proteinA,his-tag 过柱子, 想问一下会对糖蛋白的生物活性有很大影响吗(会不会没有活性)? 纯化效率是否很低? 因为牵涉到使用这些蛋白(不止一种)做功能, 对后续试验影响很大, 故急盼赐教, 不胜感激

实验有的是没办法预测的,所以我觉得你还是做了有问题再交流,通常这些纯化你严格按说明书操作应该能保证你蛋白本身的活性

色谱兄: 我用的胰蛋白酶偶联的 CNBr-activated Sepharose 4B 分不出来了, 怀疑配基掉了, 那剩余的胶还能再重新活化(环氧氯丙烷活化)再偶联上蛋白么?

环氧氯丙烷活化偶联一些酶不是特别好的选择,因为需要强的偶联条件.不过你可以试试,我觉得你分不出来会不会本身偶联就不是很成功,因为没那么容易一用就掉了,我觉得你可以选择 NHS 活化的填料去偶联,这样条件温和,时间短,还有亲和手臂,是偶联蛋白的不错的选择.你也可以买现成的偶联好的产品

我的蛋白是 3k, pH5.6 左右, 能用离子交换层析么? 用 Tris 缓冲液行么? 用什么洗脱呢? 如果用亲和, 除了 sepharose 外还能用什么较便宜的载体呢?

阴柱用 Tris 缓冲液行.洗脱在同样缓冲液中含不同浓度的盐就可以,亲和 sepharose 是最常用的,别的不好代替

我用的凝胶填料是 SephadexG-200 中粗的 40-120 微米的, 以前用的离子交换也是这个粒径的, 但是用凝胶时用恒流泵却把胶抽出来了, 离子交换 时没有这种现象, 后来在过滤网上

又加了层滤纸还是没有作用又把凝胶抽出来了！不知道该怎么控制？现在我已经把泵卸掉了！没有出来凝胶！想请教一下，谢谢！

离子交换的如果也是 Sephadex 那通常选择的基质是 G25 或者 G50 的,刚性都要比 SephadexG-200,它很软,压力和盐都容易收缩变形,所以也许你不能用恒流泵用力抽,何况它流速很慢,这样越压越紧反而流不动,泵也最好放柱前,流速要很慢,或把柱子底换成最细的筛网,有条件还是换刚性更好的 琼葡糖凝胶 G200 或 superdex 200 为好

版主你好：我是一名刚开始做实验的研究生，对蛋白质纯化还不怎么了解，我需要从一种细胞器中分离三种蛋白质。1.一种阴离子蛋白，等电点位 4.7，分子量为 4.7KD；2.几丁质酶，分子量约为 27KD 左右，它的同工酶有多种，有酸性的也有碱性的，我主要是酸性的，大约是 4.5—6.0 之间；3.葡聚糖苷酶，分子量大约为 36KD 左右，等电点约为 9.5 左右。请问版主，我应该买什么样的填料或柱子才能更方便有效的分离，最好是 Pharmacia 的，我们实验室的层析仪是那种的

1,可以先选择 DEAE 或 Q 琼脂糖凝胶,粗分后再根据分子量选择凝胶过滤的方法,你的这个选择 G50 试试.2.可以直接选择几丁质树脂亲和纯化能把这个酶 吸附,再选择离子交换等配合.3 可以直接选择葡聚糖看能不能亲和吸附你的酶,多看看文献怎么做再说,此外 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中的 填料选择指南和生物大分子分离纯化应该让你对纯化和填料选择有一些了解

版主您好！我想请问一个有关 C18 硅烷层析柱的问题！我看到文献说测量血浆降钙素基因相关蛋白（CGRP）有首先运用 C18 硅烷层析柱把血浆过滤后再测的，说是结果要准确点，不知道那个 C18 硅烷层析柱是怎么运用的、柱子的规格型号是多少、可以直接把液体加在柱子里还是要运用色谱仪？请版主您要是知道的话回答一下吧，非常感谢！

应该用的是固相萃取的方法粗纯化,你可以仔细看文献怎么操作的,什么规格即可,这样的填料和小柱子有卖的,通常 0.5-5 毫升的都有,规格不少,我觉得你还是需要仔细看文献,这样的柱子不需要色谱仪,可手工操作

我的蛋白 PI7.9，带 his-tag，但是在 PH8.0 的缓冲液里挂不上柱，该怎么调整呢？能不能用阴离子交换柱纯化？如果可以该用什么 PH 挂柱、什么 PH 洗脱呢？我是新手，有没有离子交换这方面的书推荐？万分感谢

你挂不上柱子是什么柱子,镍柱子吗,那你可以把 pH 提高到 9 试试.挂不上还可能填料本身吸附力弱,或者手臂不合适.最好先考虑亲和,此外仔细看看填料说明书,加大上样量,延长作用时间,论坛里有这样的清楚,开始挂不上,改变条件,多用填料,多上样就好了,你搜索看看,实在不行再考虑别的方法,离子交换也许 需要用阳柱,书在这个帖子里有,[www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中有填料选择指南及镍琼脂糖凝胶说明书也许有帮助. 参考书:<蛋白纯化与实验鉴定指南>、《生物工程下游技术》、《酶工程》、《酶制剂工业》《生化实验方法和技术》、《蛋白纯化实验指南》、《生化制药学》、《药物蛋白质分离纯化技术》、《蛋白质纯化技术及应用》、《protein purification》等

我在国外买的纯化试剂盒,是凝胶柱,我怎么知道里面是 什么填料,有办法吗?

看你纯化的东西分子量来判断,病毒通常都选择琼脂糖凝胶 6BFF 的多,你可直接问厂家的技术支持。

请问有没有针对金属蛋白酶的亲和胶 就象针对丝氨酸蛋白酶的 benzamidine sepharose 6b 那样

好象没有,但是要是能确定是哪个金属离子的话,可以尝试螯合特定的金属离子的填料试试,如镍琼脂糖凝胶其实可以换成各种能螯合的金属离子

请问用镍柱纯化蛋白,和蛋白的 PH 值还有缓冲液的 PH 值有关系吗? 为什么纯化后我的目的蛋白不见了?(19KD).谢谢!

缓冲液 pH7-9,避免离等电点太近就可以, pH 提高可以加大蛋白和填料的作用力. 蛋白不见这很难说,是电泳没跑出来还是没洗下来,你可以多做点样品,浓度高好跑电泳,洗脱样品透析浓缩后再跑更保险. 如果没洗下来,可以增加咪唑浓度,可以取点洗脱填料加电泳缓冲液,离心取上清跑电泳,如果有带说明没洗脱下来,没有,就说明洗脱了. 另外要注意用不同浓度的咪唑做阶段洗脱,有的蛋白作用力弱,很低浓度就洗下来了,所以自己去排除一下, www.wsac.cn 资料下载中镍琼脂糖凝胶说明书可以做参考,用于别的公司填料也是可以的

G-25 凝胶柱洗脱 BSA,洗脱剂能用蒸馏水吗 ,还是只能用 PBS 洗?谢谢 chromatography

蒸馏水通常对蛋白溶解性不好,蛋白还是需要一定的盐才好溶解,如果你不想用盐,直接选择 PB 缓冲液或者 Tris-HCl 缓冲液即可

chromatography 你好,我如何知道 BSA 什么时候洗脱下来呢,有没有什么快速的方法检测呢,我知道用磺基水杨酸可以检测,但是我昨天试了,可能是蛋白浓度太低,没有出现沉淀,所以我也不知道什么时候开始收集洗脱液阿

用紫外 280 去扫描,吸收强的应该是蛋白.或者用别的测蛋白浓度的方法去测定.收集的时候选择分管收集的方法,这样避免稀释样品

我收集了 20 管,只有三管示数较大,但还只有 0.032 , 0.041, 0.050, 我流速调的较快,试验总是不顺利

看看实验书,蛋白检测部分,此外可以提高蛋白浓度,加大点上样量

您好! 我的蛋白 38KD,His-Tag,用 GE 公司的 HisTrap FF crude 1ml, 用细菌超声破碎后上清,结合缓冲液用的是 20mM 磷酸盐,500mM NaCl,5mM 咪唑,PH 7.4, 结果挂不上柱子. 在 8M 变性条件下可以与柱子结合并可用咪唑洗脱. 请问,我想改变结合缓冲液的 PH 或采用 PH 递降的方式进行洗脱是否可行?

这个问题好象回答过几次,不是所有的蛋白都适合用降低 pH 的方法洗脱,当然你可以试试. 改变 pH 到 8.5,同时在平衡缓冲液中不加咪唑,流速慢点或者反复上样几次看能不能在天然状

态下挂上

您好。我想分离纯化一个  $pI > 7$  的目的蛋白，样品缓冲液是 NaAc-HAc，用 WCX 填料，分不同 pH 洗脱，加样品之前需要水合及平衡，这里平衡应该用什么缓冲液？原因是什么？离子交换柱会截留大分子量蛋白么？

如果是弱的阳柱,那你可以选择磷酸缓冲液平衡,原因是你需要柱子的 pH 和你的样品一致,保证蛋白能被吸附.离子交换填料通常不考虑凝胶作用,早期的 sephadex 系列会使一些蛋白进不到内孔而载量降低,琼脂糖凝胶通常蛋白都可以扩散到内部孔径.无论哪种填料都不会截留大分子量蛋白,这不是超滤膜

我是个新手,准备纯化一种分子量是 120 KD 的糖蛋白酶,提取粗酶时我用的是 pH 为 3.5 的琥珀酸缓冲液,在进行 DEAE sepharose Fast Flow 层析时用的是 pH 为 7.0 的磷酸缓冲液 (0-0.6 M KcL) 梯度洗脱,这对纯化有影响吗,如果有,是不是要先用 PEG 浓缩酶液,然后再溶于磷酸缓冲液? 谢谢了!

样品的 pH 要和你平衡柱子的缓冲液一致,所以你样品需要调 pH 到 7,看看文献和一些实验书,基本的操作还需要自己去了解,这样更系统.上离子柱不需要浓缩样品,但是样品的盐浓度也不能高,否则可能挂不上,还需要注意蛋白的等电点,只有环境 pH 大于等电点才选择阴柱,反之选择阳柱

chromatography 兄好,我是个新手.请问如果要从一些海洋动物(比如海葵、海母之类的)体内提取和纯化多肽及蛋白质有什么好的方法?我用过不同浓度的乙醇和丙酮采取冻融法提取,结果不令人满意。

我觉得这个范围太大,你可以看具体来源查相关的文献,通常需要先提取,然后再分离纯化,提取方法也不大相同,根据目标产物的特性,遗憾没接触过这方面的工作.你只能去看书和文献,具体的纯化我倒还熟悉点,或者发到外面问问.我想你需要先匀浆破碎再提取,直接提取难有好的结果

你好: 请问: 我在处理 DEAE-纤维素 52 时, 在酸碱处理前, 用去离子水溶胀时可否用沸水浴中加热 2 小时替代自然溶胀, 这个温度会对 DEAE-纤维素 52 有什么影响吗? 谢谢!

很久没用过这么老的填料,加热应该是可以的,应该不会有太大影响

我们公司最近买了一些 GE 的填料: 1.Chelating Sepharose Fast Flow, 2.Q-Sepharose High Performance, 3.Sephadex G-25 Medium, 因为在海关耽误, 在机场放着说放 4 度结果, 别人放到 -20 度, 回来 1.Chelating Sepharose Fast Flow 2.Q-Sepharose High Performance 都凝固了. 上面的保存条件是 4-30 度. 不知你有没有这方面的经历. 这些胶, 我想象中已经是坏了, 胶粒结构发生改变. 不知您有什么看法

应该关系不大,毕竟这些填料主要起作用的是填料上的功能基团,你先用用看,我觉得关系不大,至于 3.Sephadex G-25 Medium 是干粉,应该更没关系。

请问 LZ 我现在有 DEAE Dextran ,怎样处理啊? DEAE Dextran 与 DEAE Sephadex 处理方法一样吗?

DEAE Dextran 是哪家公司的产品,是球型的吗,没用过,如果真的是填料,那就一样,直接溶胀,装柱子平衡上样就可以

请问 chromatography 老师:我要用 DEAE Dextran (MWt 500000)纯化蛋白, 请你介绍介绍 DEAE Dextran 的特性, 可以吗? 另外, DEAE Dextran 500000 是不是就是 DEAE Sephadex A50 呢?谢谢!!

根据你说的应该不是填料,是离子化的葡聚糖,你最好选择 DEAE 琼脂糖凝胶.DEAE Dextran 500000 不是 DEAE Sephadex A50, 这里是指 DEAE Dextran 分子量是 500000。

楼主: 我是新手, 想问你下我做凝胶色谱,原料是过了 9000Da 的酶解液用 SephadexG-15 想把 1500Da 以下的多肽分开, 应该用什么洗脱剂呢? 还有一个问题, 我上了 1.5ml50mg/ml 的样液, 用蒸馏水洗脱了很久, 走出的线都是平的, 洗不出来, 不知道怎么回事, 还希望楼主指点一二! 不胜感谢!

有的小肽不一定在 280 处有吸收,最好选择 220,此外最好选择 20-100mM 磷酸或者 Tris-HCl 缓冲液做平衡洗脱液,此外看看文献怎么做的,SephadexG-15 分辨率不会太高的,难把这些小分子分开,最好选择 HPLC 去做

十分感谢版主的帮忙! 在这里还想请教一个问题, 就是如何对 D E A E sepharose fast flow 填料进行处理才能再次使用, 我的说明书丢了, 另外我进行压柱时一般流速控制在多少, 我的柱子是 1.5 \* 28 的, 再次表示感谢!

新的填料不需要特别处理,如果是旧的可以在位清洗即可,平衡后就可以,压柱子其实不需要特别控制,如果一定要做的话可以用 300cm/h,也就是<10 毫升/左右就可以,压力不能大于 0.3MPa. [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载下有填料清洗的方法

斑竹你好:想问一下 DEAE Sepharose FF 和 DEAE SepharoseCL-6B 刚性好,分辨率高,重复性好,实验小试后可能要大规模工业生产,请问哪一种更适合工业化生产呢,有没有更好的填料选择? 我在北京韦氏博慧填料的论坛上看到您的帖子了,谢谢你了!

DEAE 琼脂糖凝胶 FF 比 DEAE 琼脂糖 CL-6B 刚性好,至于工业化都可以,没更好的选择

我的目的蛋白,分子量 20K, PI 约 6.3, 大肠杆菌表达出来后,破菌,包涵体溶解采用 8Murea, 然后室温透析至 2MUrea, 上 DEAE- SEPHAROSE FF, 1.6\*20 的柱子, 上样量没有测定, 因为是预摸条件. 流速调定在 15ml/h‘穿透峰虽然比较小, 但是明显, 线性洗脱, 0-1M NaCl, 先有一微小几乎察觉不出的矮峰, 然后出来一个比较扁的峰形, 没有明显的拖尾. 电泳检测后, 样品蛋白即在其中. 根据出来的时间计算, 大概在 0.4M NaCl 浓度左右洗脱下来. 然后我重新制备样品, 放大了体系. 线性洗脱改为 0-0.5M, 穿透峰几乎一样, 但是洗脱后, 先前的一个很小的杂峰没有出现, 直接在洗脱后期, 出现一个扁峰形, 经电泳检测目的蛋白在其中, 但和我预计的样品数量应该产生的峰面积有差异. 我的问题是: (1) 透析过程中尿素浓度梯

度的降低,蛋白应该会开始复性,但我们的条件做不到低温透析和低温过柱,这样对于后期的蛋白复性会不会有影响?(2)两次分离虽然都得到了目的蛋白,但是峰形都是扁平状的,是否流速过慢的原因?(3)对于第二次我放大后的实验,感觉和前次的实验,出峰有所区别,不知是何缘故?(4)接下来,打算过一个 SEPHACRYL S200,一般凝胶柱,上样浓度控制在多少比较合适?(5) DEAE 柱,我用了 1M NaCl 彻底洗脱,然后应该怎么处理,以备下次使用?

1.复性不是很了解,但是不需要低温,通常室温没问题,温度太低反不利于折叠。2.峰形也许和装柱子关系更大,当然也和洗脱的方式有关。3.线性洗脱很难放大,所以不一样很正常。4.凝胶柱子关键是控制体积,5%左右的柱子体积,对样品浓度没特别要求。5.可以直接上凝胶柱子或者冷冻保存即可

我的 DEAE 柱每次用后都特别脏,变得颜色很深,我曾试过 2N NaOH, 和 4 N NaCl 洗,效果都不是很好,而且交换能力也下降比较快,请教一下我应该怎么处理用过的柱子呢?是不是用尿素来洗?

可以用 0.5M 醋酸洗试试,有的时候脏是一些不溶解或者沉淀的东西,难洗很干净,此外也可以用 70%乙醇或 6M 盐酸胍试试

请问 chromatography 老师: D E A E A-75 的特性怎样?是不是流速比 DEAE Sephadex A-25 慢啊?交换容量相差不大吧?谢谢! DEAE Sephadex G 是否就是葡萄糖的意思?

没怎么用过这类填料,刚性不好,容易收缩,特别是 A50 以上的,理论上 A-75 刚性比 A-25 差,流速也慢,交换容量应该差不多,它们就是葡聚糖凝胶,而且是交联过的,葡萄糖只是它分子的组成单元.有条件最好用 DEAE 琼脂糖凝胶代替它们

我想请教您,我要从乳中分离多肽,我把去掉酪蛋白的乳清调到 4.6(这个肽的等电点),得到沉淀溶于缓冲溶液上样,我现在用 Q XL 琼脂糖 1ML 的预装柱,磷酸缓冲液 PH6.0,洗脱峰又矮又小,是为什么呢,接下来我想在过 Sephadex 50,您看我这个步骤可行吗,多谢了

洗脱最好是提高盐浓度,我怀疑洗脱强度不够,还有可能你上样太少,也可以做上点样品.没做不这个蛋白,你可以按文献走,只是 1 毫升的柱子处理不了多少样品,再走凝胶柱子怕难得到多少东西,我觉得还是加大离子柱子为好

请问一下您有 DEAE-sephadex A-50 使用说明书吗?能不能发给我一份,我要用这个纯化酸性蛋白酶,不知道该怎么来确定洗脱梯度?我的蛋白大约是 36kDa

抱歉,没用过这么老的填料,所以没说明书,建议你还是选择 DEAE 琼脂糖凝胶代替,洗脱梯度你只能按实验书自己摸索,没办法预测的,如果你条件不好,也可以用不同浓度的盐做阶段洗脱也可以

还想问一下大家我用 sephadexG-100 层析的时候,60kDa 左右的两条带和 36kDa 的总是一起流出来,为什么呀,我用的是 1\*50 厘米和 1.6\*30 的柱子,流速 12 毫升每小时,每一毫升收集一管,最后用电泳检测发现层析液中总有三条带!

首先柱子太短或者上样量大,此外选择凝胶分离范围过宽,也许 G75 更合适.柱子最好能到 1 米左右,分离效果会好点

chromatography 兄:又来麻烦你了,我最近用 G75 纯化我的蛋白,结果过柱后大量蛋白已不见了,只有很少的一部分出来了,我用缓冲液洗了很久还是没有见我的目的蛋白,这是怎么回事呀,会不会是蛋白吸附到填料上洗不下来了?如果真是这样,那我怎么样才能把我的蛋白洗下来呢?

首先蛋白会不会缓冲液或者 pH 不合适而导致蛋白沉淀,所以改变 pH 试试,同时在缓冲液中加 0.2M NaCl 在试试

谢谢楼主的回复,(5) DEAE 柱,我用了 1M NaCl 彻底洗脱,然后应该怎么处理,以备下次使用?这个问题可能我没说清楚,我是指 DEAE 柱子,分离完成后,用 1M NaCl 彻底洗脱,在下次分离进行前,还需要进行什么处理吗?

关键看你的是怎么样的 DEAE 柱,1M NaCl 未必能彻底洗脱,所以按说明书清洗后,如果是琼脂糖凝胶可以保存在 20%乙醇中,也就是用 20%乙醇过 3 个柱体积,然后封闭 4 度保存,下次再用可以直接平衡上样即可,纤维素的填料也可以这样操作,但是 sephadex(葡聚糖类的)需要用叠氮钠等抑菌剂

楼主你好,我用的是 bio gel P6,一种聚丙烯酰胺凝胶填料,分离分子量约 3000 左右的样品片段。我最近想再买些这种填料,说明书上说它的最大承受压力是 15 磅,不知道该如何换算成 柱高,希望楼主多加指点。另外想问楼主是否用过这种填料,由于有中等大小,细,超细颗粒三种,分离范围一样,不知道用起来有什么不同

做这么长时间纯化,只在刚进入实验室的时候见过这类填料,那是 13 年前了:)但是没用过,其实这样的填料不会太耐压的,而且流速也不快,因此你可以自己试试,找个合适的流速即可,颗粒大分辨率低,但是流速快,细的分辨率高,但是流速慢,所以关键看柱子的膜能否截住填料

韦老师:今天在做反相时(用 AKTA Pilot)出现柱子前无气泡进,但再柱子后面有很多气泡出现,而且在用 PB 缓冲液洗和用 100%乙醇时没有出现,只在用一定比例的乙醇时就有,而且那管道我也拧紧了,不知道是什么原因,以前也出显过,后来不知道怎么有没了,今天又有了,郁闷!

混合产生气泡,可以在检测器后加个增压阀,你可以问 GE 的工程师,好久没用过这机器了.这样系统中有点压力应该就好了.或者改变流速试试

chromatography 兄:我有一个问题请教.我诱导了一个 GST 融合蛋白,准备做 GST-pulldown,但小量诱导后出现两条明显的带(与对照相比),用 GST beads 纯化后也有两条带,其中一条的大小与我的目的条带一致,且两条带的浓度差不多.请问,这个问题我怎么解决?我能否往下做 GST-pulldown 吗?

没办法,有的 GST 融合蛋白有时候会有 27-28KD 附近的 GST,这是没办法的事情,不过我想做 GST-pulldown 应该是可以的,你先试试看吧

chromatography 兄:谢谢了,我正在试做 GST-pulldown,不知结果会怎么样。我与几位同学讨论了一下,认为小的一条可能是我的 GST 融合蛋白没有表达完,给断了

差不多是这样,他们告诉我说就是表达到 GST 就终止了,这可能是构建或者表达系统本身的缺陷

多谢 chromatography 兄,我先用其他方法提取试试。这种提取出来的蛋白质或多肽的分子量在 1 万以下,它是一种毒素。我如果要纯化它的话,用什么柱子比较好呀? Sephadex C-25 或 Sephadex G-25 可以用吗?在哪里能够预订的到啊?谢谢 chromatography 兄!

纯化我觉得第一步最好还是选择离子交换,再上凝胶柱的好,Sephadex G-25 只能分 5000 以内的,不知道你的分子量到底是多少.可以找个凝胶柱子选择的表看看就知道.如果分子量特别小,也可以考虑选择 HPLC 去纯化

请问您有没做过在含牛血清的细胞培养上清中纯化抗体?血清浓度 1-10%,这样纯化到的抗体(电泳纯度 90%以上),做的一些检测结果能否用于新药申报?得到的抗体会不会和在无血清培养得到的抗体不大一样?

这个我还真不很清楚是不是能用于新药申报,你得问一些做过报批的人才清楚。

我想加一些标签在基因里!请问大家除了 his 外还有什么可加的呢?听说有使目的蛋白耐热的\还有使目的蛋白增加电性的等等!它们都是加了些什么东西?又导致了什么变化呢?

用的最多的还是 his 标签,别的纯化都比较复杂

我的样品是在 8M 尿素中!有什么注意事项么!谢谢您!我前两天用 deae PH9.5 做了一次感觉不好!请问如果我的蛋白在尿素中,都适合上哪些柱子?我改个 ph 会不会对结果有所改变?殊水可以么?因为听说疏水和离子刚好原理相反!那是不是就是说:做离子后就没有必要做疏水了呢?最后,您说我发现一个工艺能去些杂蛋白,我能不能按此工艺多做几次呢?这样有意义么?太感谢您了!谢谢

有 his 标签最好的办法是通过原来的镍柱优化纯化条件,别的方法都是下策,具体的方法可以参考 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载镍琼脂糖凝胶说明书中阶段洗脱的方法,此外可以用盐酸胍代替尿素试试,只要带标签,通常都是可以做出来的,别的方法条件更难摸索,也未必效果好

我想请教一个问题,我纯化蛋白过 Ni 柱后怎么除了目的条带还有好多条带,和没过柱之前基本一样,而且在除杂蛋白的那一步也有目的条带,跑电泳与洗柱(洗目的条带)液跑电泳一样.这是为什么呀?有没有好的方法(步骤和试剂)?能不能给我参考一下?

[www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中镍琼脂糖凝胶说明书可以做参考,你的问题我怀疑是样品没溶解好,或者洗杂质没效果应该是咪唑浓度比较低,你可以用不同浓度的咪唑做阶段洗脱,找到合适

的洗杂带的咪唑浓度,通常的说明书有些条件只能参考,未必都完全适合自己的蛋白,所以最好自己去摸索合适的咪唑浓度

最近要用到亲和层析,老板让我们自己制备 **bule** 琼脂糖凝胶,还给了文献(附后),我和实验室的师兄讨论认为其实亲和应该是贵在 **sepharose** 的活化上,既然他有限的使用寿命,能不能不用进口的 **sepharose** 呢?用普通的琼脂糖可以吗?你有这方面的经验吗?附后的文献用普通的琼脂糖做的,你认为可行吗?如果真的可以那应该可以降低使用的成本了,我可以这样的理解吗?

其实自己制备这个还是有点麻烦,你可以参考<蛋白质纯化实验指南-用于蛋白质组学研究>科学出版社中的 275 页,有合成的方法,最好是买现成的琼脂糖凝胶,要自己去做凝胶比较烦琐,而且颗粒未必均匀,这填料你自己合成也未必便宜多少,因为买琼脂糖加配基,再活化和时间等,25 毫升也差不多要近 一千,如果你有现成配基也许便宜点,因为那配基 25 克也要几百元

我最近正准备做包含体蛋白(含有 5 个二硫键)的纯化,打算稀释复性后先用 **SP Sepharose FF**,再用 **Phenyl Sepharose FF**,但是后来查资料发现 **Phenyl Sepharose HP** 比 **Phenyl Sepharose FF (high sub)** 的分辨率更高,而且其特别适合重组蛋白的纯化。但 **HP** 的最小包装 75ml 3000 多 RMB,而 **FF** 最小包装 25ml 1000RMB(价格差不多),我们实验室比较穷,而且也不需要太多,打算买 **FF** 的,但又不知道这种填料能将我的目的蛋白分离开吗?请做过这方面的高人给个建议!

能不能分开是很难预测的,你只能试试,你表达蛋白如果有标签的话最好还是选择亲和纯化,如果没有,那只能选择常规的方法

**chromatography** 兄:我最近刚刚接触疏水层析,请教一下疏水层析较为常用的缓冲液是什么?大概要多少浓度?好象是盐浓度越高,填料对样品的吸附力越强!那么如果样品是溶解在 3M 的盐溶液中,是不是平衡缓冲液也要用 3M 的盐溶液才能获得相应的吸附力,还是需要样品的盐浓度是 3M,平衡缓冲液只要 1M 即可?如果平衡缓冲液的盐浓度是 1M,那么样品盐浓度的改变对吸附力的影响有多大?

什么缓冲液都可以,看文献常用的就可以,浓度通常都是 20-50mM.样品当然要和缓冲液的盐浓度的一致,如果样品高,缓冲液低,有可能挂不上,反之也可能挂不上,盐浓度改变对不同的样品不一样,几句话是说不清楚的,只能去做才知道,只要不小于能吸附的最低盐浓度降低无所谓,但是小于就挂不上,所以需要从 高到低摸索

**chromatography** 前辈:我现在做一蛋白加 **GST** 标签后 55KD,用谷胱甘肽-**Sepharose4B** 凝胶亲和层析纯化后,走 **SDS-PAGE** 电泳,目的蛋白下面有很多杂带,不知是怎么回事?第一次做亲和层析的时候就是这样,我怀疑是洗柱子的时候不彻底(洗了三遍),没把杂蛋白洗干净!可是这次做的时候,洗脱前,我把柱子洗了 7、8 遍(具体我记不清了)!可是电泳结果还是一样!请您给分析一下是什么原因?谢谢!!第二道和第三道!(也就是 1 和 2 的条带!)

最下面的一条好象是 **G S T**,这是难去除的,你可以提高平衡柱子的缓冲液中盐浓度,也可以加 0.5% 吐温等,避免非特异吸附,同时留意破碎的条件要温和,破碎完马上纯化,看看这

样会不会好点,同时上样的浓度不能太浓,一定要很澄清,而且你可以用改变纯化的 pH 试试

我现在在纯化一个天然蛋白的时候,过了一次 DEAE sepharose FF 后,样品加硫酸铵至 1M,上 octyl 4 ff (high sub),目的蛋白挂上去了,洗脱顺序是含 1M 硫酸铵的缓冲液液--1M--0M 线性梯度洗---不含硫酸铵的缓冲液洗,都没有把目的蛋白洗下来,最后用水洗下来了,但我电泳后觉得还有比较多的杂带。我应该怎么优化?

也许是吸附太牢固了,没分开,可以用低浓度的盐做阶段洗脱,如 0.1M,50mM,0 等阶段洗脱试试。线性洗脱还是有点粗放,也可以选择高分辨率的填料如苯基的试试

你好!我想请教一下:我现在用 GE healthcare 公司的 Protein G sephrose 4 fast flow 来纯化单抗,那柱子去年 12 月份用的,用后一直放在 4 度冰箱用 PBS 保存,现在拿出来想继续用的时候,发现柱体有裂缝,流速太快,请问这柱子还能继续用吗?该如何处理?

加大流速,直到没气泡没缝就可以,也许你的填料有点干了,如果方便的话也可以重装一下,如果是预装柱那就按我前面说的处理应该差不多

请问 chromatography 老师,Ni-IDA 和 Ni-NTA 除了对盐的稳定性外.还有什么区别吗?.他们的操作过程一样吗?

镍琼脂糖凝胶 FF 的配基是最经典的 IDA,镍离子有六个螯合价数, Ni-IDA 螯合了三价,剩余三价,而 Ni-NTA 是四价的,剩余是两价,因此 Ni-IDA 琼脂糖凝胶作用力要比 Ni-NTA 琼脂糖凝胶的强,也正因为这个原因,所以在同样条件下 Ni-IDA 洗杂质和目标蛋白的要比 Ni-NTA 的咪唑浓度高,但是 NTA 的填料更稳定,耐受更强的还原剂,更不容易脱落。而 IDA 的载量要比 NTA 高,可以反复利用,更加经济。镍琼脂糖凝胶由于配基密度高,需要更强的洗脱条件,特别是和 NTA 类的填料相比,镍琼脂糖凝胶需要 50-100mM 咪唑洗去杂质,也可以直接在上样的样品中加 30-40mM 咪唑提高特异性,洗脱也许需要高到 500mM 咪唑。所以不能完全照搬 NTA 填料的洗脱条件。镍 NTA 琼脂糖凝胶,它一般要用 25-40mM 咪唑洗杂蛋白,用 250-400mM 咪唑洗脱目标蛋白,同样可以在上样样品和平衡缓冲液中添加 10-20mM 咪唑提高特异性。而具体用哪个填料完全看个人的习惯以及纯化的条件而决定。

不好意思,还想问一个:我采用的纯化的方法是亲和层析,不过我的配基是小分子物质——对氨基苯甲酸;文献报道的载体是用环氧氯丙烷活化,我想问一下,有没有这种活化好的填料,那个公司有售,价格如何?对纯化后的蛋白用 RP-HPLC 进行纯度的鉴定,流动相是三氟乙酸+乙腈,可不可以用乙酸来代替?

[www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载下有环氧活化琼脂糖凝胶说明书,你可以做参考,通常价格是 25 毫升/1500 元左右,不过我觉得最好是选择长手臂的,三氟乙酸不能用乙酸代替

谢谢您的答复。那么长手臂的凝胶有哪些,能帮忙推荐一下?谢谢!

那网站下的填料选择指南中就有目录,里面就有你需要的产品,你也可以选择进口的同类产品

楼主你好：请教您一个问题，就是能告诉我 Hydroxylapatite column 的原理吗

羟基磷灰石填料广泛用于核酸和蛋白的纯化，酸性和中性蛋白能被填料的钙离子吸附，盐不影响吸附和洗脱，这样的蛋白需要用低浓度（30-120mM）的 pH7.0 的磷酸盐缓冲液洗脱。碱性蛋白被磷酸根吸附，盐会影响吸附和洗脱，所以洗脱可以用盐或者高浓度（120-500mM）的 pH7.0 磷酸盐缓冲液洗脱。www.wsac.cn 资料下载中有更详细介绍球型羟基磷灰石的材料

请问楼主，现在市面上还有 S-Sepharose 这种填料吗？我找了好久也没找到卖这种填料的

S-Sepharose 是什么填料呢，你要用它来做什么实验，是 SH-Sepharose 吗，你告诉我要它做什么，我才好告诉你该选择什么

S-Sepharose FF 是一种离子交换填料，跟 SP-Sepharose FF 差不多，只不过配基上少一个羟基，现在市面上没有了，郁闷中！

如果按你这么说，那多一个羟基也没多大差别，难道 SP-Sepharose FF 不能用吗，我没觉得这会有太大差别。你是说手臂上的羟基还是硫原子上的羟基。

S-Sepharose 的手臂是  $\text{—O—CH}_2\text{—CHOH—CH}_2\text{—O—CH}_2\text{—CHOH—CH}_2\text{—SO}_3$ ，Sp-Sepharose 是  $\text{—O—CH}_2\text{—CHOH—CH}_2\text{—O—CH}_2\text{—CH}_2\text{—SO}_3$ ，少一个羟基

多个羟基应该没什么特别用处，少一个也影响不大吧。我们的填料就是  $\text{O—CH}_2\text{—CHOH—CH}_2\text{—SO}_3$ ，但是都称为 SP 琼脂糖凝胶

chromatography 兄：你好！我是纯化蛋白的新手，现在想从肌肉组织中纯化一个蛋白酶体的亚单位，此蛋白分子量为 47kDa，PI 大概在 4.8-5.1 之间，请问我该如何设计纯化策略？我想先过离子交换柱，再过分子筛，但柱料或柱子那么多，又不知如何去选择，还请 chromatography 兄多多指点

www.wsac.cn 资料下载上的填料选择指南和生物大分子分离纯化策略应该有帮助，此外查文献看这个酶能否选择亲和纯化的方法，如果没有按你的蛋白特性，可以选择 Q 琼脂糖凝胶和 G75 类的填料，也可以选择疏水如苯基琼脂糖凝胶，方案还是需要具体去试才知道，所以最好看文献别人怎么分的，那填料就好选了

你好！我的蛋白是用大肠杆菌表达的重组蛋白，软件测得 pI 为 6.9，本来是带有 his-tag 的，但 Ni 柱挂不上去，现在想改用离子交换，不知行不行，应该选用什么样的柱料和什么样的条件呢？

千万别改，挂不上你可以换一家镍柱颜色更深，配基密度更高的也许就能挂上，或者在变性条件下去挂，离子交换很难得到比较纯的蛋白。如果按你的蛋白等电点，阴柱或者阳柱都是可以的，关键看你蛋白在什么条件下更稳定

请教一下：我的蛋白 29KD，我是用谷胱甘肽琼脂糖 4B 做纯化的！用那种 10ml 的柱子装 1ml

琼脂糖过柱纯化的, 问题一:我是否可以自制那种小柱子,比如说用注射器管,可是问题是那柱子下面的那层膜是什么?用滤纸代替可以吗?多大孔径合适?问题二:我需要较大量的纯化蛋白应该怎么做?(不想一次一次过那那种小的柱子)

可以自己做柱子,只要用棉花堵住注射器下孔,填料不出来,能流动液体就可以,纯化大量的蛋白可以做大点的柱子,如 10 毫升的,如果更大,那你可以直接在漏斗上做也可以 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中有 GST 琼脂糖凝胶说明书中有纯化的例子,你可以参考

chromatography 兄: 你好, 新手请教问题: 我们纯化的蛋白 PI 为 5 左右, 未修饰的分子量为 50kDa, 现想纯化并保持其修饰形式, 但我们还不知是什么修饰, 只知该修饰很大, 请问那种纯化方法以及贵公司哪种柱料能达到这种目的? 顺便再问一下, 如果选择球形羟基磷灰石, 该柱料适用吗, 对纯化我们的 蛋白有哪些优缺点?

我记得回复过,如果分子量差别大的话可以考虑凝胶柱子,至于什么填料关键看你这两蛋白分子量的多少决定,我们琼葡糖类凝胶应该能满足你的要求,你也可以选择离子交换看看,会不会修饰后电荷不同,当然也可以选择球型羟基磷灰石,至于纯化你们蛋白有什么优缺点真很难说,因为实验只有做了才知道,我们的球型羟基磷灰石是琼脂糖凝胶为基质的,颗粒圆,流速快,重复性好是它的优点.但是所有羟基磷灰石填料缺点是不耐酸,所以不能在低 pH 缓冲液条件下使用.pH 最好大于 7

chromatography:您好! 新手请教您问题! 前一个月我都在自己合成亲和层析填料,使用的是环氧氯丙烷活化的方法,然后连上一个小分子配基——对氨基苯甲酸,感觉效果好像一般,用小的柱子(0.5\*6 cm)还能分开;然后我换用大一点的柱子(1\*14)的感觉分离的不好;与柱子的大小有关吗?然后感觉自己合成的介质不是很理想,想换用活化好的载体,然后直接偶联配基,是不是效果会好些?因为刚接触不久,不知道怎么选择,您能具体推荐一下吗?

应该和柱子大小关系不大,也许你放大后条件没摸好,此外这个填料也有一些非特异吸附,如苯环的疏水性,苯甲酸的阳离子作用都会干扰特异吸附,所以你需要在平衡缓冲液中加入一些盐可以避免离子作用,加一点表面活性剂如吐温等可以降低疏水相互作用,这样也许效果更好.你合成也许手臂过短,或者偶联配基密度过少,所以你可以选择活化好的填料,你选择 epoxy 活化琼脂糖凝胶就可以,[www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中有这个填料的说明书你可以参考,目录中有价格,你也可以选择 GE 的 epoxy-activated sepharose 6B

十分感谢! 文献中报道的平衡缓冲液含有 0.03M 的 NaCl, 不过没有加入吐温。您推荐的填料好像和环氧氯丙烷的活化的机制相仿;我看到还有一种 NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow, 它也是和氨基结合, 它与对氨基苯甲酸的偶联效率如何, 请您给预高见

填料虽然看起来类似,但是实际上它的手臂更长,更适合小分子,NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow 偶联后形成的键不稳定,pH 范围 2-9,特别是只偶联一个点的小分子,这样容易配基脱落,对大分子还好,对小分子不大赞成用它,除非形成的酰胺键是必须的那没办法,而你的不属于这样情况,所以选择环氧活化琼脂糖凝胶应该是最佳选择

你好, 有个阴离子交换问题想请教一下, 蛋白是可溶表达。57KD, PI=5.38, 带负电荷, 现想使用阴离子交换进行纯化, 之前蛋白已经硫酸氨处理, 在 20%-30%处获得沉淀。现在不

知道您对此有什么推荐条件，缓冲液。PH。洗脱条件（NaCL）

没什么，你可以选择 20mM 左右的磷酸盐缓冲液，pH7-8，洗脱很难说，你可以选择线性洗脱也可以选择阶段洗脱，你的样品需要用上面的缓冲液透析，否则挂不上，当然你也可以直接上疏水色谱柱如苯基琼脂糖凝胶，自己多看看实验书和文献，这样可以更系统了解纯化。否则很难做好

请问，如果一个糖蛋白组成不均一，（糖链长短不同），如何分离不同的组分？硼酸梯度？ConA 亲和？

都可以尝试，没更好的办法，硼酸琼脂糖凝胶亲和适用的糖种类更多，而 ConA 亲和只能结合少数种类的糖，如果分子量差别大你可以选择 HPLC 凝胶柱试试，当然也可以选择 HPLC 的离子柱，如果不是制备，只是分析，那高效毛细管电泳是最好的选择

想在自己的目的蛋白后加上 6xhis 标签以便后期纯化，在 c-端和 n-端加有什么区别吗？在 his 和蛋白质之间需要加入其它氨基酸吗？再补充一点，准备在 his 和蛋白之间加一个蛋白酶切割位点，想问纯化后如何切割，切割后如何回收目的蛋白呢？

理论上两端应该差不多，但是看在哪端不影响活性，同时有很好暴露容易纯化为好，所以不同蛋白是不一样的，只能做对照才知道，如果要酶切的话应该需要酶切位点，可以先纯化是不洗脱目标蛋白，直接在柱子上切，这样也许更好，然后洗下来就可以得到目标蛋白，标签等都挂柱子上，然后再洗脱更好，收集可以分管收集或者根据检测按峰收集即可，上游构建和纯化后加工，你发外面问问，我只熟悉纯化和填料

有没有针对金属蛋白酶性质的纤溶酶的亲和填料，或者可以合成出来，比如用纤维蛋白作为配基

我觉得可以选择金属螯合的蛋白去挂特异离子去看看能不能吸附，此外这样的蛋白通常和凝血酶类似有抑制剂，所以可以用抑制剂做配基做亲和纯化，如 T P A 可以选择赖氨酸琼脂糖凝胶，E T I 琼脂糖凝胶等，如果它是丝氨酸蛋白酶还可以选择苯甲脒琼脂糖凝胶，当然我也见过文献用纤维蛋白做配基纯化 T P A 的，这些都需要试才知道，我想也许这里面就有适合你的。你也可以查文献也许更好，也可以和填料合成的合作

我现在刚着手做蛋白的纯化，纯化一种磷酸化蛋白，有 2 个磷酸化位点。但原核表达之后，由于磷酸化程度不同，共有 4 种磷酸化状态的蛋白。使用 sp sepharose beads 进行过柱纯化，希望得到双磷酸化的蛋白，可是每一次都有无磷酸化的蛋白污染，不能完全分离。请问你是否做过类似的试验，有什么好的建议？

磷酸化的蛋白之间差别很小，很难用离子交换去纯化达到你的目的，也许你可以考虑亲和或者颗粒更细的高分辨率的填料甚至直接用 HPLC 离子柱也许能分开

我用金属螯合亲和分离，用 Ni 离子螯合的，可是发现包括我的组分在内很多蛋白都挂上了，用 PH 梯度 2.5-7 冲洗，杂蛋白和目的蛋白分不开一齐冲下来了。后来改用 5.0, 4.5, 4, 3.5 ,3, 2.5 的 PH 值进行阶段冲洗发现在 4.5 时也是一齐冲了下来，后面更低 PH 冲洗不下来

什么,我想是在 4.5 就被全部冲出来了.我现在想换用 NH<sub>4</sub>CL 竞争性洗脱,但是前面 PH 洗脱结果摆在那里,会有好的结果吗?以前曾用锌离子螯合,目标蛋白和杂蛋白又全部挂不住,或者再试试从 5.0 到 4.5 的洗脱?但我觉得分辨率不会那么精确到每变化一个 0.1 单位的 PH 就会有不同的蛋白洗脱出来吧.头疼

太低 pH 这样也许镍离子都会洗掉,或者对蛋白没作用力,因此你可以用不同浓度的咪唑做阶段洗脱试试

我做亲和层析,可是层析图,前面的杂蛋白总是出峰很慢,洗得也很慢,形成一个很大的坡峰,有可能是什么原因,我的柱子 (1.0\*14cm),柱长不够,还是上样量太大了,请指教

也许你平衡缓冲液浓度过低,洗脱能力不强或者因为 pH 等原因蛋白溶解不好等,样品一定要澄清透明,此外如果盐不影响吸附可以适当加 0.5M 左右的盐,可以避免因为离子作用的干扰

chromatography 老师,您好。我的问题如下,请指教。ECH Sepharose 4B 的处理以及和亲和配基的偶联(英文): ECH Sepharose 4B (Pharmacia Biotech, 10 ml containing 12–16  $\mu$ mol of amino hexanoic acid moiety/ml of drained gel) was washed on a sintered glass filter with 80 ml of 500 mM NaCl/ml of gel added in several aliquots. This washed gel was taken up in water (10 ml, previously adjusted with dilute HCl to pH 4.5) and then treated with affinity precursor (10-fold molar excess) in dimethyl sulfoxide (10 ml) and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide HCl (Sigma; 15-fold molar excess) added as the dry powder. After reaction for 24 h on a rocking platform at room temperature, the adsorbent was washed as above with 3 cycles each of 3 gel volumes of alternating 100 mM sodium acetate buffer (pH 4) and 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8), each containing 500 mM NaCl, and then with 3 gel volumes of 50% dimethyl sulfoxide in water, followed with water. The adsorbent was suspended in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 0.1% Triton X-100, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 3 mM EGTA, 0.1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, and 0.02% sodium azide (isolation buffer of Breer et al., 1985). This slurry was poured into the column and equilibrated with 10 gel volumes of isolation buffer. 中文翻译: ECH Sepharose 4B 填料 (Pharmacia Biotech, 取 10 毫升, 每毫升抽干的填料含有 12–16 微摩尔的氨基己酸) 在 烧结玻璃漏斗中洗涤。洗涤液为 500mM NaCl 溶液, 是按照每毫升填料加 80ml 的洗涤液进行多次洗涤。洗好的填料倒入 10ml pH 为 4.5 的盐酸溶液中, 充分混匀。混匀好的填料与溶解在二甲基亚砷中的亲和前体 (affinity precursor) 进行充分反应, 在向填料中加入亲和前体的同时也加入了 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide HCl 干粉。在室温条件下, 上述的混合物在脱色摇床上摇动反应 24 小时以上。之后, 该混合物利用 3 倍填料体积的 100mM 乙酸钠缓冲液 (pH 4) 和 3 倍填料体积的 100mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 8) 依次洗涤并循环三次, 这两种缓冲液中均含有 500mM NaCl。洗完之后, 该混合物用 50% (V/V) 的二甲基亚砷水溶液进行洗涤, 并抽干。之后, 该填料混合物溶解在 10mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 中。该 buffer 中含有 0.1% Triton X-100, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 3 mM EGTA, 0.1 mM 苯甲基磺酰氟, 以及 0.02% 叠氮钠 (即为 isolation buffer)。最后将这填料装填到层析柱中并用 10 倍填料体积的 isolation buffer 充分平衡。本人的操作为: 1、用量筒取 10 毫升 ECH Sepharose 4B 填料倒入可抽滤的漏斗中用 500mM NaCl 溶液洗涤。2、洗好的填料倒入 10ml pH 为 4.5 的盐酸溶液中, 充分混匀。(该盐酸溶液是预先配制好的。) 3、将原先为固体的亲和前体 (affinity precursor) 用二甲基亚砷溶解, 同时称取所需量的 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide HCl 干粉, 完毕之后将这两者

加到第 2 步中的填料溶液中，手动充分将他们混匀。（是用锥形瓶盛装的。）4、混匀之后，把锥形瓶放在脱色摇床上，在室温条件下，让它们充分的反应 24 小时以上。5、反应好之后，用 3 倍填料体积的 100mM 乙酸钠缓冲液(pH 4)洗涤。6、再用 3 倍填料体积的 100mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 8) 洗涤。7、再循环两次 5, 6 两步操作。8、洗完之后，该混合物用 50% (V/V) 的二甲基亚砷水溶液进行洗涤，并抽干。9、该填料混合物溶解在 isolation buffer 中。10、填料装填到层析柱中并用 10 倍填料体积的 isolation buffer 充分平衡。注：所有溶液及试剂的用量都与英文中说的相同。我的问题是： 1、对于这段英文的理解是否存在偏差？ 2、我根据这段英文而设计的操作是否有不妥之处？ 3、对于 ECH Sepharose 4B 与配基的偶联，你能否给点好建议？

基本是没什么问题,但是我觉得文献有一些不大好的地方那就是通常在偶联这样的情况下,那 pH 为 4.5 最好是最初的 4.5,因为有时候加配基及 EDC.HCl pH 是会变的,这样也许会导致不成功,所以你还是需要检测混合后的 pH,如果不对能调整到 4.5 为好,别的没看出有什么不妥,其实最好是选择 NHS 活化的琼脂糖凝胶,这样羧基已经变成活化酯这样偶联带氨基的物质快而且简单,偶联效率也高,最好是不用这文献的方法。

谢谢 chromatography 老师的回复。对于 pH 值我是调的,但只能用 pH 试纸来调,因为用 pH 计调的话很不好操作(溶液量太少,pH 计的电极头几乎无法完全浸没),我不知道这么粗放的 pH 调整方式是否可行?这里面对 EDC 和亲和配基往 Sepharose 4B 填料里添加的顺序和时间上是否有讲究啊?我按照上述方法做完亲和和层析之后,在紫外监测上没有显示出峰形,收集的样品经透析、浓缩后跑 native PAGE 以及 SDS-PAGE 都没有目标条带。是目的蛋白没挂到亲和柱上吗?还是其它什么原因呢?我已经重复实验好几次了,都没能获得目的蛋白。每次重复我都是用新的填料和新的配基,钱花了不少啊,但啥结果也没有,急啊。(我做的是天然膜蛋白的纯化。)

你的配基是什么,首先你需要保证填料合成成功,你跑电泳没带也许是因为浓度太低,你可以吸附清洗后直接取点填料加电泳缓冲液,离心取上清跑电泳看有没有吸附,如果没有那说明没挂上你目标蛋白,你的配基是什么,文献可靠吗,此外膜蛋白提取肯定没问题吗.总之都去排除看看问题在哪里

谢谢老师,我会按您所说的去尝试。所用的配基请老师看附件。该文章是发在 Journal of Neurochemistry 上的。对于粗膜蛋白的提取,应该是没问题的,我跑电泳检测过的。另外,我所说的那种粗放的 pH 调整方式可行吗?您对 pH 的调节有什么好的建议吗?

反正 pH 越准确越好,你可以选择精密 pH 试纸也许更好,其实在离心管里 5 毫升就能测定 pH,也许你 pH 计电极太大,你的配基是自己合成的吗,那你首先还必须保证配基合成是成功的,你可以用红外等看看是不是结构对,此外偶联加 EDC 后要马上调 pH,我想也许是你合成配基不好,或者偶联配基密度不够造成的,对这样的按氨基的配基,能用 ECH sepharose FF 偶联的最好还是直接选择 NHS 活化的琼脂糖凝胶这类的代替,偶连容易且偶连效率高。不用你说的这样烦琐的方法。

谢谢老师的回复。我所用的配基是自己合成的,经过核磁鉴定是正确的。该配基在水中的溶解度很小,在进行配基偶联反应时是先将配基溶解在 DMSO 中,然后再加到处理好的填料中,随后再加入 EDC 干粉。反应开始的两个小时内对反应体系进行 PH 的检测并调整,随

着反应的进行，反应体系中 原来溶解的配基慢慢的析出来了，对于到底有多少配基偶联到填料上了，我不得而知，也不知道如何去检测。哎，不知如何是好啊。chromatography 老师您觉得这里面有配基偶联上填料了吗？这里面对于 EDC 和亲和配基往 Sepharose 4B 填料里添加的顺序和时间上是否有讲究啊？

那你可以用定量方法检测偶联前和偶联后的浓度,看是不是偶联上,或者检测填料上有没有吸附上你的目标蛋白,也许溶解不好,没偶联上也可能,此外精确测定 pH,加 EDC 后就需要马上调 pH

我要分离一个酸性蛋白 180kd 左右,想用离子交换初步分离一下,用弱阴好么,用多大的缓冲液,pH 多少,新手,没用过啊.(是 DEAE 的阴离子柱,据说重复性不好,不知道是不是),另外是不是用 10%,20%...90%这种浓度梯度洗脱呢.

pH7.0 20mM Tris-HCl 缓冲液,样品也尽量这样即可.离子交换选择 Q 琼脂糖凝胶或者 DEAE 琼脂糖凝胶都应该没问题,洗脱可以选择你说的那样阶段洗脱,重复性都 应该没问题,线性洗脱重复性差也许和设备有关,不是填料本身的问题.多看看一些实验书或者问周围熟悉的人更好

感谢您的回复！我会尝试一下提高 NaCl 的浓度。我的蛋白混合物是天然产物，有颜色，而且有些粘稠，因为我的目的蛋白要求保留很好的活性，所以并未对样品进行前期操作，就是溶于适于结合配基的平衡缓冲液（pH 一定）中，然后离心，去除不溶性杂质，然后就直接上样，因此有时会出现堵塞的情况。您能给予一些建议吗？

离心有时候代替不了过滤，所以样品最好还是需要过滤，同时可以稍微稀释样品，这样避免堵柱子

您好！我想问一下目前进口 epoxy-activated sepharose 6B，15g 的价位是多少？谢谢！

应该在 550 美金左右,但是比价看你在哪里买,通常至少也需要 1:9 以上,关键看你要偶联什么配基, [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载下有类似填料说明书可以参考

上次请教过您的，我的蛋白带 his，但挂不上 Ni 柱，您说可以考虑变性条件下挂柱，但我的蛋白是重组蛋白，复性困难啊，怎么办呢？如果用疏水柱（苯基），该如何确定目的蛋白与柱子的亲和力呢？如何选择挂柱的 pH 质呢（pI 大概 6.9）？怎么设计预实验？楼主有相关资料么？

你可以稍微变性一下如用 2 - 3 M 尿素，这样结构不至于破坏，但是标签暴露更好也许能挂上，你还可以选择别的公司配基密度更高的填料，哪家填料颜色越绿，配基密度越高，这样也许能挂上，此外有的公司的镍填料配基和填料间的手臂不够长，所以挂不上。

疏水通常选择中性 pH，但是也看你蛋白稳定性而定，你看看疏水色谱手册或者相关实验书，[www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中有生物大分子分离纯化策略也许有帮助，包括抗体纯化的也可以参考。我建议你先选还是亲和的镍柱，别的都难得到好的结果，怕你走弯路还白费钱

如果某一个蛋白的等电点在 4 左右，能否算出在离子交换树脂中，用多大的盐浓度洗脱下来。

不知道是否有经验值？另外，脱盐的方法最简单快捷的是哪种，不知道贵公司是否有这方面的填料或技术支持。

没经验值,不同的条件是不一样的,除盐最好选择葡聚糖凝胶 G15 或 G25 即可,这是很常见的,没特别材料

用毕赤酵母来分泌表达 mIL12, 我现在要上清中分离纯化 mIL12, 蛋白上没 his 标签等。请各位帮我参考一下该用什么方法(超滤、亲和层析、离子交换层析、凝胶过滤等)分离纯化, 谢谢。

这个东西文献应该不少的,你查最新文献看看,我没做过,不过我觉得能用亲和是最快的方法

各位蛋白纯化的高手,小弟有个难题请教: 1、先讲一下我要分离的蛋白,是大肠杆菌表达,形成了包含体,复性,用镍柱纯化,制剂,可见异物不合格,现在怀疑是某种不稳定的构象引起的,或者说复性不完全的蛋白聚合引起的。(该蛋白为碱性蛋白。) 2、HPLC 反相柱分析,是单一峰,但用 CHT (羟基磷灰石 II 型, 20 微米) 的柱子却分出好多峰,条件越细化,峰越多。分析有几种可能: 甲硫氨酸不均一表达; 复性不完全, 构象不同。在用 CHT 纯化时, 是用 10mM-200mM 磷酸盐梯度洗脱的, 蛋白在分离过程中, 构象是不是会改变? 这样是不是就失去了分离不同构象的意义了。我分了几个峰, 然后拿去做质谱了。用浓缩管离心浓缩的时候是不是也容易引起构象变化, 或者说变性? 我还拿几年前的样品分离了一下, 发现峰的个数和洗脱的位置都差不多, 就是有一个峰变大了, 另一个峰变小了, 是不是说明随着时间的延长, 一个构象转换为另一个了? 变多的构象应该是稳定的才对阿, 不稳定的物质有转换为稳定构象的趋势吧, 同时该构象也应该是活性差的吧, 这样也就是说活性差的构象, 反而是稳定的结构, 这又和我们的出发点矛盾了, 分离的目的是为了去除不稳定的结构阿, 防止可见异物不合格。有点迷糊了, 高手来解释一下。另外, 有没有更好的办法来分离或者找到可见异物不合格的原因? 哪里有卖羟基磷灰石 HPLC 分析柱的? 我是在 AKTA 上用的自己装的柱子, 我用的磷酸盐是 pH7.5 的, 可是平衡柱子时 pH 却不是 7.5, 好象浓度越高, pH 越高, 200mM 的 8 点多, 10mM 的 7 点多, 甚至 6 点多, 怎么回事呢, 我看说明书, 也说 pH 很难平衡, 那如何通过 pH 来优化洗脱条件呢? 好象不太好实现啊

好象没听说 CHT 能把不同构相分开,有峰也未必就是完全不同的蛋白.这问题不是很清楚,你发外面问问,难平衡是因为浓度太低,提高浓度就会快点.可见东西不合格应该是有蛋白沉淀,你需要解决稳定性的问题。

我刚购买的 whatman 公司 p-11, 说明书是说 store in a cool and dry place。请问常温保存可以吗? 冰箱保存的话是不是容易吸潮?

应该可以常温.冰箱 4 度密封的话也不会吸潮的

您好, 我想问一下我用镍柱纯化蛋白后, 用 40mM 咪唑洗还有杂带, 要在提高咪唑的浓度吗? 还有我在纯化的时候, 刚上上样品的时候过柱子大约 10ml 后, 柱子上层开始堆积一些黄色的东西, 是我蛋白浓度太高了吗? 还是其他原因? 谢谢!

当然需要提高,有的镍柱需要用 50-100mM 洗杂带,不同蛋白是不一样的,影响因素比较多,所

以最好做一系列咪唑浓度做阶段洗脱,找到合适的洗杂带的浓度和洗目标蛋白的浓度,www.wsac.cn 资料下载下镍琼脂糖说明书有例子可以参考,此外还需要注意样品处理.黄色的物质如果不是色素沉淀那就有可能是填料上的镍被还原,缓冲液和样品中不能有太高浓度的还原剂

chromatography:请问,蛋白溶液中含有核酸加入 DNA 酶和 RNA 酶降解后是否就不影响过柱子了?

可以降低粘度,关键看什么柱子,对离子柱特别是阴柱,无论有没有酶处理都会影响吸附的,疏水也如此,对亲和也许影响小点

SCX 液相色谱的条件: 流动相 A: pH 3, 含 5%乙腈的 5mM 磷酸二氢钠缓冲溶液, 流动相 B: pH 3, 含 5%乙腈和 1M NaCl 的 5mM 磷酸二氢钠缓冲溶液。请问 chromatography 老师, 磷酸二氢钠的浓度低么, 想用这个条件分离蛋白? SCX 4.6\*250 的柱子, 蛋白最大载样量是多少

5mM 磷酸二氢钠缓冲溶液应该不低,柱子的载量我也不很清楚,因为这和你分开的程度有关,你可以上 1 毫克左右应该没问题.如果分不好再降低量,机器的上样体积是固定的,所以你上不了多少样品的

求助: 关于海藻蛋白质纯化问题: 我从海藻中纯化一种未知的活性蛋白, 2 个问题困扰 (1) 样品制备时总蛋白得率极低, 只有海藻湿重的 0.04%; (2) 离子交换作初纯时, 样品很难挂到柱上去。请问如何解决? IEC 细节如下: 首先用 DEAE sepharose FF, 柱床体积 25mL。0.1mol/L NaOH 洗 3 个柱床体积→0.1mol/L HCl 洗 3 个柱床体积→纯水洗回中性→0.01mol/L pH7.0 PBS 平衡层析柱→上样, 0.01mol/L pH7.0 PBS 缓冲液洗回至基线→高盐阶段洗脱。发现穿透峰为主要活性组份, 电泳表明, 活性蛋白分子量约为 18KD。另外, 1mol/L NaCl 洗脱组份为次要活性组份, 目的蛋白分子量超过 100KD。鉴于主要活性组份在 DEAE 层析中位于穿透峰中, 换 CM sepharose, 在 pH7.0, 0.01M 的 PB 缓冲系统中上样, 在淋洗时发现, 全部样品都被洗脱, 换高盐洗脱液未出峰。从现有结果看, DEAE 还能得到初步纯化效果, 但活性组份一个位于穿透峰中, 一个位于最高浓度洗脱缓冲液中, 2 个活性组份的离子吸附特性差别极大, 如何协调? CM 时所有蛋白都没有吸附上, 可能是哪些方面出错?

有两个地方有活性,但是它们未必是同样的物质,所以不需要考虑怎么合并的事情,如果 CM 挂不上,只能用阴柱,多做几个浓度,这样分开点,再过别的柱子,用电泳来检测纯度

您好! 我想问一下, 常用的配基偶联效果的单位是配基 (mg) /载体 (g) 的单位吗? 一般的范围是多少, 要达到多少值, 才能算是偶联成功呢?

对大分子的配基如蛋白等,通常是 10-20mg/ml 的比例去偶联,对小分子通常 0.5-1mM/ml 去偶联,是否成功那看做完后的纯化效果,如果可以那就算成功

感谢您的回复! 我的配基是小分子的物质, 我通过波长扫描, 检测它的最大吸收峰; 通过紫外检测, 利用差值得方法, 进行偶联效果的评定, 可不可以? 琼脂糖在 60 摄氏度的稳定性如何, 在 4 度冰箱或者 0~4 度怎么样?

可以用你说的方法检测,做好标准曲线就可以. 交联后的中性条件下没问题,但是碱性太强,时间长对刚性会有点影响,在4度冰箱或者0~4度20%乙醇很久都没事

chromatography 老师您好!今天真是遇到了很奇怪的事情,填料合成后,检测偶联率达到12mg/ml,本来以为蛋白能够很好的挂在柱子上,但是纯化图一点也不理想,目标蛋白峰很小,真是有点让人头疼.平时合成过几次,偶联率只达到5~7mg/ml,但是纯化的效果还可以.好奇怪.请 chromatography 老师帮忙解答一下

如果你测定是正确的,那这样的现象应该不会有,对同一活化的填料而言,配基密度提高,载量也提高,你多做几次看看,或者彻底再生你的填料,再做纯化试试,会不会什么地方出问题了

我刚开始纯化一种糖蛋白酶,它的热稳定性很好的,但我在过分子筛时出现有蛋白峰,分离也可以,就是一直检测不到酶的活性,上样前活性还是比较大的,我用的是PBS缓冲液,PH7.0,是不是酶活性被抑制了,还是浓度太低检测不到呀,可是我一加大上样量就只出一个蛋白峰了,请多多指教,还有5个月的实验时间,马上就要毕业了,急呀.另外可以把你手头如何纯化酶的方法和纯化时出现分离不好任何处理方面的资料发给我点

你样品过柱子前有活性吗,如果有的话是不是因为上柱子后酶需要的一些东西被分离而没活性呢,所以你还是看看文献,同时每步都留意看活性在哪里没有,什么因素影响这样才能解决你的问题

关于 Glutathione Sepharose 4B 清洗的问题!取一点 beads 跑电泳后,在25 kDa-32 kDa 之间有明显的一条 band,量还不小,估计是酶切后留在 beads 上的 GST.于是用2倍体积 elution buffer 清洗;5倍体积 PBS 洗;然后2倍体积 6M 盐酸胍洗,5倍体积 PBS 洗;然后2倍体积 70% 乙醇洗,5倍体积 PBS 洗.洗后又取一点 beads 跑电泳,在25 kDa-32 kDa 之间还是有明显的一条 band,量也没有明显减少.有什么办法能把 beads 洗干净啊!50多毫升的 beads 难道没救了么

你可以用 0.5M NaOH 清洗试试,此外也可以加点胰蛋白酶,看看会不会好点,[www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中有 GST 琼脂糖凝胶说明书中有填料的再生,你可以参考看看

我要从弓形虫体内提一种 70kDa-100kDa 左右的蛋白,能破坏宿主细胞膜的一种蛋白酶,温度敏感,37摄氏度活1h,pH7.6.低渗破坏大.80年左右,用反复冻融三次,超声离心的方法从上清液中获得粗提物,有蛋白单体和多聚体,后来就没有改方面的研究了,我现在想改进它的提取和纯化方法,还像增强它的稳定性,然后找找关于他的别的用途,我是菜鸟中的菜鸟,大概从那几个地方考虑课题设计,你能指点一下吗?

我对你的酶不很了解,我觉得你还是多看文献看影响活性的因素,这样才能找到解决的方法,至于纯化你可以看看文献有没有好的方法,然后再来讨论.发一些材料你自己参考

师兄你好啊,我也是刚接触这个东西,我现在准备做偶连蛋白质的分离,我准备采用 S-300 聚丙烯酰胺葡聚糖凝胶,采用生理盐水做缓冲液,你看这个缓冲液行吗/我也没有做过,都是上一个师姐留的资料,我现在最大的问题是装住以后大概一天半左右就在竹子的中间出现

了断裂，做了几次都这样，我的填料是新的，但时间比较久了，不知道是什么原因，我装住以前用生理盐水跑了很长的时间啊，怎么会这样，有人建议我用活化剂泡一下，你看这个问题怎么处理啊

不知道你要分离的分子量范围是多少,个人觉得 S-300 范围有点宽,缓冲液应该没问题,柱子中间断裂也许是因为有气泡,所以要留意缓冲液的温度,同时装柱要没气泡,可以看看说明书,一般对装柱子都有比较详细的说明

我想请教一下，对于 ECH Sepharose 4B 填料，如果已经和配基进行过偶联反应，但做完一两次亲和层析操作后怀疑亲和配基没偶联到填料上，那么该填料是否还可以拿来再次与亲和配基进行偶联操作，以便再次用来进行亲和层析？如果可以的话，该填料该如何处理呢？也就是说通过什么方法处理后能使用过的填料达到再次与配基偶联的要求？

你可以把填料清洗后再重新偶联,这个填料这样做是可以的,填料需要彻底再生,保证没蛋白等杂质,方法和普通填料再生一样即可.我觉得你还是偶联的效率不高才效果不好的，最好是直接选择 NHS 活化琼脂糖凝胶代替直接偶联最好。

谢谢老师。对于柱子再生，我不太了解，能麻烦老师您就 ECH Sepharose 4B 这个填料的再生说详细点吗？非常感谢！

[www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载下有常规填料再生的方法,你去看看参考一下。

你好，请问，我的目标蛋白在 90KD 左右，His-tag 的，但是每次 Ni-NTA 纯化出来，总是有 70KD 左右的蛋白一起洗出，可能是降解产生的，而且好像表达的时候在菌中就被 cleavage 了，我能用 Sephadex G75 分离 90KD 目标蛋白和 70KD 左右的杂蛋白嘛？

普通的 Sephadex G75 是很难把它们分开的,你可以选择不同浓度的咪唑做阶段洗脱,[www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载的镍 NTA 琼脂糖凝胶说明书可以做参考.亲和实在没办法你可以选择离子交换试试

我在做原核表达蛋白，蛋白是带 his-tag 的，用 Ni 柱纯化后跑 SDS-PAGE 发现目的蛋白邻近处有两条条带,做了 WB 附近的两条条带也有显示,但比较模糊,是否说明我的蛋白降解了,另问你用 Ni 柱纯化是在常温下还是 4 度?我是在变性条件下过柱的,4 度时含尿素的 BUFFER 易结晶,很难流.如果是蛋白降解了,你有好的方法避免降解吗?或者我将这三条一并拿去打抗体,仍能产生有效抗体吗?

变性条件下蛋白不会水解的,所以常温纯化即可,不需要 4 度,也许表达的时候就是那样,那就没办法了,你做纯化的时候可以做更精细点,[www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中有镍琼脂糖凝胶说明书,你可以参考.用不同浓度的咪唑做阶段洗脱试试,如果就这样去做抗体应该也可以

如果是融合蛋白，有 HIS 或 GST 标签，纯化时就可以用抗原抗体亲和层析吗？谢谢

带 HIS 或 GST 标签分别选择镍琼脂糖凝胶和 GST 琼脂糖凝胶做亲和纯化就可以,没必要选择抗原抗体免疫亲和层析,因为抗体太贵,没必要. [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中有些材料,你看看

会有帮助的

chromatography 老师:谢谢回复,很高兴你的指点,我现在又装了一次,效果还可以,十分感谢,有了问题在沟通啊,我的目的蛋白分子量应该在 100-200 之间,选择 S-300 不知道分离的效果怎么样,你经验多,请指点指点,再次非常感谢你的无私帮助,好人一生平安!

别客气,能解决你的问题我也很高兴,蛋白分子量 100-200KD 是吗,如果这样的话 S-200 会效果更好,当然你现在没这填料,你也可以先试试你有的 S-300 的效果再说

chromatography 老师您好: Agilent Zorbax SCX 柱(4.6\*250mm, 孔径, 300A 5um 粒径) 是硅胶键合, 带磺酸集团, 分小分子的肽肯定没有问题了, 但是能否分离蛋白呢? 能否根据 pH 梯度分蛋白, 如何摸索条件?

理论上纯化蛋白也没问题,但是洗脱建议用盐洗脱,不建议改变 pH,因为也许那样蛋白溶解不好容易堵柱子,而且也不好做线性洗脱.你可以参考别的离子柱子的洗脱条件去摸索即可

chromatography 师兄好,我是今年考上研究生的,我想在开学之前看看有关纯化的书,我在丁香园上看到过一本英文教材,可是,我英文水平有限,想问问你,在中文教材中有没有好的参考书。

[www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中有一些纯化的中文材料,. 参考书可看:<蛋白纯化与实验鉴定指南>、《生物工程下游技术》、《酶工程》、《酶制剂工业》《生化实验方法和技术》,《蛋白纯化实验指南》,《生化制药学》,《药物蛋白质分离纯化技术》,《蛋白质纯化技术及应用等

请教楼主: 我用 proteinA 亲和柱纯化抗体, 使用 PH3.0 的柠檬酸洗脱, 为了保证活性要及时调 PH, 但是由于下游使用限制, 不能使用带氨基的物质, 即使很低浓度的, 所以 Tris 不能使用, 我试过 PBS, MES, 碳酸盐缓冲液 调起来都很费力, 需要很大体积。楼主能推荐点替代 Tris 的么, 谢谢

哦, 那你可以直接用固体的碳酸钠, 或者用三乙氨等, 这样没伯氨应该可以, 你试试好了

chromatography 老师您好! 我想请教一下, 我现在要纯化一种 17KD 的蛋白,大概需要纯化出 60mg 上实验动物,我实验室有 Ni 预柱,但有点小,得到的量很少,如果用低压层析仪的话,也就是凝胶过滤层析,不知道可不可以?还是用离子交换柱好呢?我应该考虑那些因素?

凝胶过滤难得到好的结果的, 何况也不便宜, 有条件建议换更大的柱子, 或者选择国产的, 10 毫升不到 1000 元, 这样最多两三次就可以得到你需要的蛋白,, 你也可以直接买填料 25 毫升 / 1500 元. 这样一次就可以得到你需要的蛋白, 别的都没办法实现, 而且时间很长, 效果不好, 成本还不一定便宜

问您一个盐浓度的问题。亲和层析中平衡缓冲液中的盐浓度如果大了, 目的蛋白是不是容易被洗下来; 小了, 杂蛋白洗脱得很慢。我的洗脱液中的盐浓度是 0.5M, 平衡液中是 0.03M, 洗脱液上柱后很快就洗下来了; 可是平衡液洗杂蛋白时, 好慢, 而且不容易到基线。我想问一下, 可以把平衡液的盐浓度升高嘛, 根据文献报道说这是最佳的结合浓度了?

你可以适当提高开始缓冲液浓度或者干脆加 0.1 M 盐试试,总之需要自己摸索开始的浓度,而且这样也许洗到基线会快点.至于还洗脱液基线下降如果很少可以不考虑,原因是因为两溶液背景不同混合时难免有点波动,没关系的

洗脱液最终洗完回到基线后,接着还会继续下降,降的比较多,想问一下可能的原因?

洗脱和平衡缓冲液对于检测器来说不一样所以会这样,或者因为机器的波动,可以不管或换个别的缓冲体系试试

请教问题:对于蛋清寡肽脱盐,选用什么样的方法好?选用什么样的树脂

1000左右的可以选择葡聚糖凝胶 G10 或者 15 就可以

目的蛋白是酸性磷酸化糖蛋白 分子量 60KDa, 等电点 4.46-3.59, 样品是脱脂牛乳 第一步是离子交换 DEAE-Sephacel, 将脱脂乳与 DEAE-Sephacel 混合过夜后灌柱(文献描述), 我不明白为什么要脱脂乳与 DEAE-Sephacel 混合过夜后灌柱呢, 一般不都是上样进行层析吗? 很少看见这样混合后灌柱子的. 可以用什么别的方法改进吗? 我的第二步和第三步分离都是用 Phenyl-Sepharose (25ml), 但是第一步出来的目的蛋白峰溶液体积很多(大约 100ml 多), 我应该怎么能浓缩后上样呢, 我现在的上样量只有 2ml, 那样的话我就不知道什么时候能提到一定量的目的蛋白了? 文献说在 1L 牛乳中含有我的目的蛋白 8mg. 如何提高产量啊!

混合也许是为了吸附更充分, 其实可以直接在柱子上操作, 不一定非要这样, 因为可以降低流速或者循环上样就能达到同样的效果, 建议选择 DEAE 琼脂糖凝胶的填料代替, 毕竟它刚性更好, 更好操作, 疏水, 亲和, 离子交换这些吸附色谱不需要浓缩样品, 它们本身就可以浓缩富集样品

chromatography 老师您好: 我也想过换填料, 但是开始实验买了 DEAE-Sephacel, 买的是 500ml, 挺贵的还等了一个月才到货, 现在也不敢在和导师说再买填料, 我只能用它分了, 还要请教的一个问题是做纯化除了一些书上说的试管实验以外, 有必要做正交吗? 我的分离方法是按一个文献做的, 如果没有什么不同之处, 我很难毕业! 也许可能被说抄袭, 我想做条件优化, 但是不知道怎么进行优化, 我现在能考虑到的就是缓冲液 pH 和洗脱的盐浓度进行摸索, 但是也很难避开重复实验的罪名

那就没办法了, 可以先不混合, 直接上样试试, 但是样品一定要过滤而且很干净, 我觉得混合是不是因为乳品不好过柱子, 你怎么也先按文献做做才能改进, 而且多看看书, 这里通常讨论的都是遇到问题解决的方法, 而不是泛泛谈方案, 这样意义不大. 你工具都是一样的, 改变的余地不会太大的

chromatography 老师您好! 我想请教您一个问题. 我用 Ni-NTA 纯化蛋白, 咪唑浓度到 150mM 是目的蛋白已经流出, 但资料都是用 250mM 的, 我应该用哪个浓度呀? 咪唑浓度对我目的蛋白有没有影响? 流液我应如何保存以便后面实验?

不同蛋白,不同公司的填料洗脱的咪唑浓度不一样,所以你的 150 就能洗完全那当然按你自己的条件即可,保存看你做什么实验,通常都是透析或者超滤等除去咪唑-20 度保存

chromatography 老师您好!如果在亲和层析中,杂蛋白的洗脱过程中,出现两个峰或者多个峰,可能原因是什么?如果目标蛋白中,也出现了两个峰,能说明什么问题吗?

双峰的原因可能至少有两种.一是确实因为组分不同,所以出来的次序不一样,另外的原因也许是装柱子的时候不匀导致,你可以电泳检测如果两峰一样那就重新装柱子试试

混合蛋白脱盐用什么方法比较好,不知道是否有商品化较便宜的东西,在哪可以买到。问题比较多,还请 chromatography 老师耐心解答啊。谢谢!

超滤、凝胶柱或透析都是不错的选择,但是到底选择什么看自己的习惯或条件,就收率和速度而言我倾向于凝胶柱脱盐,而且无论样品体积大小都可以。如果是少量样品,又没柱子和设备,那透析也可以,超滤也可以,但是也需要有设备。www.wsac.cn 下去看看,有除盐柱 5-10 毫升的手工柱,也可以直接买葡聚糖凝胶 G15 或 G25.此外可以在各试剂公司找到透析袋,GE 公司也有除盐柱和填料,包括超滤的,小点超滤离心管密理博公司的比较多

chromatography 老师您好!我做蛋白纯化已经 2 个月了,先是用镍离子琼脂糖亲和层析,QIAGEN 公司的,效果还可以,但由于我的处理不当,在没有脱镍下,加了 NaOH,结果柱子效果变得很差.后来用鼎国的,效果更差,很多杂带.不知道你有什么好的建议?我现在打算用 CM- Cellulose 和 DE-52 两个柱子来做,你觉得怎么样?因为我以前从来没有做过,所以对纯化还是有点摸不着头脑.我只有 1.6\*30cm 的柱子,够长吗?

最好还是选择镍柱去做,别的方法我觉得否是白费时间,尤其是不很熟悉纯化的人,1.6\*30cm 的柱子够长了,但是建议还是用镍柱纯化

您好!请教一个问题,我表达的蛋白是带 histag 的,纯化效率特别低,而且纯化出来的蛋白在沉淀中,我不知道怎么测定它的蛋白浓度,以及后续的 ELISA 中怎么用这个蛋白,谢谢!

也许你填料本身载量低或者条件没控制好,沉淀问题你需要了解蛋白的稳定性,你看它在不同 pH 的溶解度也许能找到不沉淀的条件.纯化得到的不应该的沉淀

离子交换吸附后无法洗脱是什么原因?今天做蛋白纯化实验,条件摸索。用复性完毕的蛋白经 DEAE-Sepharose 吸附后,缓冲液冲洗,然后开始用含 1M 的氯化钠的缓冲液洗脱,经测定,没有洗脱下来,最后用 10M 氯化钠也没有洗脱下来。蛋白确实是吸附上去了,可就是洗不下来。缓冲液 PH 为 8.5,而蛋白等电点估计在 7.5-8.0 间,这是怎么回事啊,有什么办法能洗下来呢,或者改用什么条件可以呢?

原因估计是 pH 和等电点太近,加上高盐导致蛋白沉淀,你的蛋白最好是选择阳柱为好,这样也许对蛋白稳定性更好

楼主:你好!我也最近做纯化包涵体,用凝胶层析时不小心把柱子干了,后来未煮凝胶直接装柱的,在稳定过程中发现柱面最上层的凝胶边缘呈很小的刷状,请问这对纯化影响大吗?

是不是因为凝胶中进了气泡导致的呢？

不知道刷状是怎么样,所以很难判断,不过我觉得也许是气泡穿过填料层导致的。你可以上样试试,如果没影响那就没关系,如果影响那就搅动柱上一薄层填料,重新让填料沉下成平的就可以。

请教 chromatography, 同样的样品(100ml)上不同体积的阳离子柱(1ml 和 10ml), 进行梯度洗脱的过程中, 得到的样品浓度是一样的吗, 10ml 的柱子得到的样品会不会被稀释, 谢谢

如果你的样品能保证 1ml 和 10ml 都满载量的话,那就应该没稀释,所以讨论稀释与否关键看你样品中的蛋白量,如果连 10 毫升不满载的话,那当然会有一些稀释.但是稀释多少还是取决于目标蛋白的量和洗脱的方法

请教:我有 ethe-toyoparl 疏水胶, 但没有说明书, 能否参照贵公司的苯基琼脂糖凝胶 FF 说明书使用呢?

抱歉,没查到这个型号的填料,应该是 Toyoparl ether-650, 疏水色谱填料的使用方法差不多,所以是可以做参考,但是盐浓度得适当调整和自己填料的疏水性匹配,也就是能达到分离效果即可.但是我觉得你还是问厂家或者上他们的网站上找到说明书更好

我们实验室有个普通层析柱装 Sephadex G-150 胶总是漏, 流速非常低的时候也照样漏。以前好象听说下面塞点棉花可以解决问题, 但又怕会因为堵而增加柱压。恳请楼主帮忙!

最好是问厂家换更细的筛网,通常卖柱子的都有卖的,如锦华或者上海华美等做柱子的都有.棉花也难保证挡的很好,而且也许会影响峰形和分离效果,这个填料也太软容易变形,所以流速一定要很慢.否则填料变形就能穿过膜

做离子交换的时候,用 uv 检测,比如说 BSA 蛋白,一般大概多少量才能在 uv280nm 下看得到,我 400ug 蛋白都没有看到吸收,怎么回事?如果您作过其他蛋白也可以跟我们分享一下.谢谢

这和你检测器测定的灵敏度和量程等有很大的关系,你可以先别过柱子,直接注射点蛋白过你的检测器看看检测器是不是有问题,如果没问题,那再连柱子,而 400ug 显然是浓度不高,何况过柱子还稀释,我想你还是加上样大量为好.同时检查仪器本身有没有问题

1. 我看的文献分离蛋白的都要经过好几次纯化一般是 DEAE cellulose , 然后亲和层析, 然后离子交换层析或者 DEAE sepharose fast flow,它们之间的先后顺序会影响我的分离吗? 2. 有师兄说要买填料订完以后还要等 3 周的样子, 都是这么慢吗? 3. 我想用亲和层析分离菌体蛋白,但是他们说一定要有一种亲和剂才能把目的蛋白挂到柱子上面,我看文献没发现啊,只看到用不同的洗脱液洗就会出现不同的峰, 是这样吗?

1, 次序很难说,我想有的次序安排是有道理的,有的不一定,所以你只要选择适合你的就可以,否则越看越糊涂,此外最好可以先开始做实验,一边做一边学习. 2, 填料关键看你定什么或者哪家的,有的也没那么长时间. 3, 亲和是不错,但是有些蛋白也不一定能找到

合适的亲和填料去纯化，你尽量多查文献看看。此外可以看一些纯化的书，多问问周围熟悉纯化的人，这样会更容易上手

我只想分析，不要大规模制备

那你可以找一些大学的分析中心或者研究所的类似机构,只要有条件的都能给你做蛋白分析的实验,价格应该也不贵

你好，我想问一下，有没有地方可以进行分离纯化的实验室或公司把样品送过去就行的？有的话多少钱呢

那看你是分析还是制备，不同制备量，不同纯度，不同难度，不同表达量价格都有区别，你得很公司谈才能知道具体的价格，至于公司你可以搜索看哪家公司提供纯化服务即可

小弟很菜 刚做纯化 想问问 chromatography 师兄，我看文献的纯化用到 sephadex G-200，但是现在这个东西好象不好买 听人说那东西也不好，有没有什么替代品啊 和 sephadex G-200 分离效果一样的

可以选择 superdex 200 或琼葡糖凝胶 G200 代替，肯定好用。

谢谢啊 能不能再问一下 大概的体积是体系是多少的 用 sephadex G-200 是 104cm\*1.4cm (长\*直径)

需要 250 毫升的填料,最少也需要 200 毫升

sephacryl s-300HR 可不可以？因为我要纯化的蛋白分子量是 700k 文献上说的，sephadex G-200 分离的分子量只能到 270k，我觉得这篇文献是不是骗人的啊

不一定,如果你的杂带都是小于 270k 的,那文献也没问题,sephacryl s-300HR 也可以试试

chromatography 大侠,想请教您,我的融合蛋白有 e-tag 抗性,大量表达出来之后用具抗 e-tag 的柱子进行纯化,但是纯化完做电泳一直都有杂带

对这个纯化我不很熟悉,你的亲和柱子是自己合成的还是成品呢,杂带原因有不少,你平衡缓冲液中要多加点盐,避免因为离子作用导致的杂带,同时上样后应该用缓冲液多洗几个柱体积,洗脱的时候如果是降低 pH 的方法,你可以多设定几个 pH 洗脱试试

chromatography 老师您好,又一个问题要请教您,我自制的 SA-sepharose 亲和层析柱,现在要连接 biotin 标记的抗原了,抗原大小在 25KDa 左右,我不太清楚抗原上标记 biotin 的数量大概在多少范围内比较合适.我的理解是越少越好,但是为了保证与 SA 的连接效率及连接的稳定性可能还是要稍多一点,所以我想初步打算用 4 个 biotin 标记一个抗原.您可以给我一点建议么?

这个没做过,不过如果你的抗原是蛋白,那通常连 5-10mg/ml 应该足够.可选择 NHS 活化

琼脂糖凝胶就可。

chromatography 老师您好,我之前没有做过色谱,现在想要纯化一种蛋白,想分离它的单体和四聚体,有文献用分子筛色谱,我看他的柱子用的是 HiPrep TM16/60 Sepharcryl S-200 HRcolumn,想问一个特别菜鸟的问题,有卖这种装好的柱子的吗?还是必须自己装柱子呢,一次性的预装柱有卖的吗?

这柱子本身就是装好的预装柱,你可以找GE公司的,他们有,但是这柱子需要好的纯化机器,否则怕不一定好用,你也可以买填料自己装,这样的柱子上样不多,只能上1—6毫升左右

chromatography 老师:非常感谢您的答复,我不太懂,我原来打算有一个色谱柱,有蠕动泵,有紫外检测仪,就可以分离了,还需要什么样的纯化仪器呢?

预装柱的接口很难连到常规机器上,而且怕流速快了就漏,所以当然最好是选择进口的层析设备做,如果象你的条件不知道行不行,自己问ge公司为好,我也不大清楚能不能用

有些资料有下面的定义: 1.对离子交换剂的处理、再生和转型的目的是一致的,都是为了使离子交换剂带上所需的平衡离子。如对阴离子交换剂用NaCl处理可将其转为Cl型,用NaOH处理可转为OH型。2.分离蛋白质时,一般不能使用H或OH型离子交换剂,因为分离过程中H或OH离子被置换出来都会改变层析柱内pH值,影响分离效果,甚至引起蛋白质的变性。因此我想问一下,如果我的DEAE-S-FF经过0.5M NaOH--注射用水冲至中性----缓冲溶液平衡----分离蛋白和2M NaCl----注射用水冲出---平衡----分离蛋白,两种方法对蛋白有什么影响吗?

应该没什么影响,你试试看就知道

请问一下,纯化GST融合蛋白的时候用什么buffer可以最大限度的去除杂蛋白?

通常可以加盐避免离子作用的吸附,如果没改善可以加1%左右吐温看能不能好点,如果都没用,那就需要留意你的样品,破碎要温和,提取后尽快纯化等,避免因为降解导致的杂带,因为万一小片段也带GST就很难纯化了

chromatography, 请问一下,我现在用的是Qiagen的Ni-NTA Superflow纯化我的目的蛋白,已经做了将近一个月,但是我的蛋白一直挂不上柱子,该优化的条件也优化了,我想是不是填料有问题啊!因为我发现我的填料用0.5M NaOH洗的时候有变黄的现象,且我用1M NaCl洗的时候填料也有变白的现象,我想填料是不是有质量问题啊?如果不是的话,我应该怎么来优化我的条件呢?

如果你填料变黄,而现在又没颜色了,无论哪个情况都会导致填料挂不上蛋白,所以你需要重新螯合镍离子再试试,实在不行就得换填料, [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中有镍NTA琼脂糖凝胶说明书,里面再生的方法你可以参考

谢谢你,我现在发现我的蛋白挂不上柱很可能是我的样品没有处理好!所以我想请问你我在

提取包涵体时怎么确保包涵体完全释放呢?能告诉我一个你提取包涵体的方法吗?

你可以各部分分析一下看问题出在哪里,你样品跑电泳如没你目标蛋白就说明提取不好,如果有说明样品没问题,提取可以用电泳检测就知道了,如果沉淀中没多少目标蛋白了,那说明提取已经差不多完全

请教您,我用 Q XL 做第一步纯化分子量约 6000 的多肽,想再过凝胶 G-75,但如何脱盐呢,我现在有一个小的 G-25 脱盐柱,能用吗,还是用透析什么的,请您指点,谢谢!

最好选择 G-15 的更保险. 透析如果截留分子量 5000 的也难截留住

您好。我正在做 his 融合蛋白纯化,昆虫表达系统表达的,有活性状态下纯化。用的是 Amasham 的 Ni 已经加上去的做好的 1cm 的柱子 (Hitrap FH)。第一次做的时候,提前做好好的 B 缓冲液是 50mM 磷酸缓冲液含 100mM NaCl, 0.1%DDM(因为纯化的是膜蛋白), 1mM Imidazole, A 缓冲液是 50mM 磷酸缓冲液含 100mM NaCl, 0.1%DDM, pH8 然后利用机器的程序 10, 20, 100, 250, 500mM Imidazole, 目的蛋白溶出,可是配置 B 缓冲液的时候,忘了调 PH 值到 8,后来发现是 10。结果在 1M Imidazole 才出现蛋白 (280mM),不知道目的蛋白是否出来了,浓度太低(上样量 100ul,70ug/ml),没有检测出来。用完了的柱子用水洗, 20% ETOH 洗, 4 度 保存。结果第二次做的时候,上样量 1ml,70ug/ml,结果目的蛋白在 flowthrough 的时候就出来了。我现在想法是: 1. 这个膜蛋白, his-tag 被包埋(设计在 N 端),无法挂柱。2. 第一次做的 pH 的错误,导致蛋白沉淀(此蛋白的理论 PI,6 左右),这个柱子废了,导致第 2 次做的时候不能挂柱;或者是缓冲液中界面活性剂的浓度太低,导致蛋白沉淀。3. 继续降低 NaCl 的浓度,可能挂柱。您能帮我分析一下原因吗?还有一个问题,缓冲液配置的时候在室温,纯化的时候是在 4 度的环境下,这样的话,是不是要求,PH 调制的时候要在 4 度下调制?

1,那你可以在变性条件下试试。2.再生柱子,恢复到原来。3 降低盐没用,温度不是问题,没关系,你上样太少,至少需要上几个毫克,否则白费时间

chromatography 谢谢您的指导,我再提高浓度做一遍。再问您 2 个问题: 1) 这个蛋白最重要的是活性,所以避免在变性条件下纯化,变性以后恢复应该很难吧?没在变性条件下,纯化过蛋白。2) 我表达这个蛋白的时候加入了 2 个 tag, his 还有 flag,纯化的时候先过 flag 再过 his,因为我是从组织中纯化这个蛋白,杂蛋白的含量非常高,所以过了 flag 柱子以后蛋白就变得很稀了,纯化度当然也很高,80%左右,只有 2 条杂带了(CBB),浓度 70ug/ml 左右,想提高这个起始浓度有困难,同时组织的量不是很多。想再过 his 柱子,用 GE 的 hitrap FH 1ml 的柱子,蛋白的量至少需要多少才可以呢?

1,那你换个新的柱子试试,如果你要在天然状态下可以换新柱子或者再生柱子后再试试,上样怎么也上到 10 毫克左右

有个问题一直困扰着我。就是我在离子交换后要做疏水,可在浓缩的样品中加硫酸铵溶液或固体的时候总是会产生沉淀,只要加进硫酸铵就会有混浊(即使浓度很低)。如果说是盐析我想请教楼主:硫酸铵分级沉淀的原理是什么呢?在不同浓度下沉淀出不同蛋白是不是也根据蛋白的疏水性大小的不同?

你样品浓度过高,加盐容易沉淀,所以可以把样品稀释再加,同时加后需要调 pH,因为硫酸铵是偏酸的,这样可以避免沉淀的发生。沉淀原理说法不一,大多是说破坏蛋白表面的水化层并且中和表面电荷,导致蛋白聚集沉淀.应该和疏水性有多大关系,没说明

好象不是因为浓度高,我是用氨水调节的 pH,在蛋白浓度同样高的情况下,加相同体积的 4M 氯化钠不会沉淀,而加 2M 碳酸铵会沉淀。所以我想改用氯化钠做疏水,应该也可以的吧?还有氯化钠的浓度是不是应该是硫酸铵的两倍?

我在前面说了加硫酸铵后还是要调 pH 的,不调是不对的,你也可以用 4M 氯化钠上疏水柱,但是不一定是 2 倍

chromatography 你好,我是蛋白纯化这方面的完全一个菜鸟,这里有几个问题想请教阁下,我准备从昆虫体内直接对粗提蛋白进行纯化,(纯化的蛋白对象是 GSTs),也看了一些这方面的资料,其中几篇文献中提到粗提液经过前期处理后 load on GSH-reduced agarose gel column 上,有些纳闷,单从这点来看可以看出是亲和柱吗,那填料是不是就是琼脂糖?还有一点想问的是,作为纯化对象 GSTs 的亲和底物,GSH-reduced 应该是配基吧,怎么添加在柱子里面的?另外,关于填充后的柱子是否可以多次使用,大概多久后需要重新更换填料?最后,我们实验室订购了多个 凝胶过滤预装柱和 GE 公司的 HiTrap Chelating HP 亲和预装柱,倘若我重新订购了其他亲和预装柱可否使用原有的 HiTrap Chelating HP,而只是把新订的填料注射进去?事实上,关于柱子的填充,制备这块我是一头雾水,而且国内以 GST 为纯化对象的好象也不多,这里小弟恳请大哥对柱子填料,制备等有关纯化这方面的基本内容做下阐述,万分感谢!

选择 GST 琼脂糖凝胶就可以,它的配基正是 reduced GSH,洗脱也用 reduced GSH 就可以了,详细操作可见 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中的 GST 琼脂糖凝胶说明书,HiTrap 亲和预装柱都是封死的,不能重新装填料的

首先谢谢 chromatography 的推荐,我已经下载并看了 GST 琼脂糖凝胶说明书,这里我想问的是 GST 琼脂糖凝胶毕竟是填料,那还需要重新买柱子吗,如果这样的话我们实验室已经订购的几个柱子(有亲和柱和凝胶柱)不就没有意义了?这些柱子应该都是可以重新加填料利用的吧?还有配基是怎么加柱子的啊?老板催的急,目前我打算用最简便的方法,恳请推荐

你可以买装好的柱子的预装柱,也可以买填料,如果你们有现成的柱子那就买填料即可,我不知道你们的柱子是怎么样的,你得问买的人或者卖柱子的公司,不是所有的柱子都可以重装,配基已经通过化学键合把 GSH 偶连到琼脂糖凝胶上了,最简单的就是买装好的柱子,在目录下的最后就有,你可以直接邮件或者电话联系即可

非常感谢 chromatography 兄的回复,我会按你的意见尽快订购预装柱的,还有一点疑问的是:开始从 GE 公司订购 AKTA 系统的时候随机附带了一批不同规格的柱子,每个都标了 EXP:2008 年 6 月,这是柱子的最终寿命期限吗还是启封截止日期而已,一般预装柱和普通柱子的使用寿命大概各是多久(例如 GST 琼脂糖凝胶柱)?

EXP:2008 年 6 月应该是失效日期,不过过期用也可以,不同填料的使用和维护等因素,寿命很

难说,但是通常可以几十使到几百次都有可能,这取决于你样品的干净程度及维护方法。

chromatography 师兄你好,我现在做尘螨的分离纯化,我想先用 G-50 粗分,但我没有办法确定缓冲液(我用的是磷酸缓冲液)的 PH,我查了文献,都是关于尘螨中过敏原蛋白的,而且这些蛋白的等电点等资料也不全,只知道这些过敏原蛋白差不多都是碱性蛋白酶,大部分已知的酶如下:半胱氨酸蛋白酶,胰蛋白酶,淀粉酶,胰凝乳蛋白酶,谷胱甘肽-S-转移酶,溶胶原丝氨酸蛋白酶,原肌球蛋白,副肌球蛋白,载脂蛋白,几丁质酶。其他蛋白都未知,所以对 PH 很没有底,谢谢师兄指教!

你看文献怎么做先试试吧,有问题再说。如果实在没法选,那通常提取蛋白都在中性,选择 pH7.4 试试.

楼主您好,本人遇到困难,需要援助!我手头有提取后的蛋白缓冲液,其中含有多种蛋白,但具体不是很清楚,只知道有两种分子量大概为 45kd 和 35kd 的,现在需要把这两种分别纯化出来;请教楼主,将如何选柱和填料?

如果你什么信息都不知道,那我也不好说,但是思路应该先上离子交换,再上凝胶柱子好点,具体选择得根据你做离子交换后的电泳图来才能确定。

感谢楼主,因为我研究的这种物质,在国内几乎查不到资料,所以提取的本物质的蛋白也不确定是什么蛋白,只知道大概的含量和分子量。我现在需要高纯度的纯化 45 和 35 这两种蛋白,我想先用离子柱,再用凝胶柱,但填料不知道怎么选取,希望楼主给予指点!

你不了解等电点很难选择离子交换的填料,通常的凝胶柱子是根本没办法把 45 和 35 分开的,所以你需要先过离子交换柱子,如果能分开最好,或者可以用疏水苯基琼脂糖凝胶,离子交换由于不知道等电点,你需要 Q 琼脂糖凝胶和 SP 琼脂糖凝胶,差不多都需要 25 毫升

请问 chromatography,一般的琼脂糖凝胶填料多大的离心转速它不会破

1000-2000 转左右应该没问题

请问 chromatography 老师,我在做一种蛋白的纯化,这种蛋白国内的相关文章很少,目前只知道它的分子量为 10kD 左右,等电点为 4.5,水溶性,其他的性质不知道。我现在用硫酸铵沉淀后用超纯水溶解,SDS-PAGE 得知除了目的蛋白外,还有大小 25-40kD 的几种杂蛋白,怎么样才能纯化到我的目的蛋白呢,要求有活性的,不能变性。多谢指点!

我觉得最好是先过 DEAE 或 Q 琼脂糖凝胶,先分离,然后看杂蛋白分子量再选择合适的凝胶柱子去分离,如 G50

你好,我想请教一下,我要过柱分离和层析人血清 IgG 蛋白,我在装柱和过柱时应该注意些什么问题,在纯度鉴定时通常采用什么方法?

装柱子过柱子等可参考相关的实验书。IgG 蛋白我觉得最好是选择重组蛋白 A 琼脂糖凝胶做亲和纯化,有现成的柱子和填料,不需要自己装柱子,如果选择凝胶柱或者离子交换柱子,你可

以查文献,装柱子需要看实验书,这里很难说的很详细,纯度通常都选择电泳,也可以选择 HPLC. [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中有抗体纯化的方法,你可以去看看, 纯度一般就选择电泳或 HPLC

我在作一植物蛋白的提取和纯化,用盐析的方法的方法可以得到好多结晶。我很吃惊,总不会得到这么产品吧?用什么方法进一步纯化?最好是能工业化的方法?如果用层析的话用什么竹子比较好而且有经济?还有用什么方法检测纯度或者蛋白含量?

结晶可能是盐,并不是蛋白,纯化最好是参考文献或者别的工艺,如果没有那你就只能自己去摸索,通常都是离子交换或疏水,然后上凝胶柱子,纯度和含量通常可以选择电泳和 BCA 法,这样笼统的问题在这里恐怕让你失望了,因为这里大多是讨论做过程中的细节问题,而这样什么信息都没有是很难有什么参考性建议的, 希望谅解

离子交换或疏水?离子交换一般用什么树脂? 疏水什么意思?

就是离子交换色谱或者疏水色谱,离子交换最常用的就是 DEAE,Q,SP 或 CM 琼脂糖凝胶.疏水的填料有苯基,丁基或辛基琼脂糖凝胶, 其他的概念可参考一般色谱书。

麻烦你,我想问问,我想分离分子量在 35KD 左右的蛋白,希望可以排除分子量在 40 多 KD 和 20 多 KD 的, 不知道我应该用什么填料最好, 希望你可以给我推荐几种, 谢谢您了。

很难有常规的凝胶柱子能把 35KD 和 40 多 KD 的分开,建议先过离子柱看能不能分开,或者别的方法,如果一定要用,那可以选择 G75 的填料试试

请教一下 chromatography 老师: 我用 0.5M 的 NaOH 处理 DEAE 树脂, 15min 后, 用蒸馏水洗时, 发现树脂变成了絮状, 而且上清漂浮了很多泡沫, 还有一些树脂沉不下来漂浮在液面上, 请问这是怎么回事啊, 碱酸碱处理不对吗?

你的是什么填料,是纤维素吧,这样很正常,主要是填料压紧后同时又有一些比较粘的杂质可能就是絮状,泡沫不知道是什么原因,也许你里面还有蛋白没洗干净所以这样,有泡沫这样会带一些填料到表面,你搅拌让泡沫破裂这样填料应该能沉下来,具体的操作你参考说明书吧,纤维素这样的填料很难用,最好选择 DEAE 琼脂糖凝胶代替

谢谢 chromatography 老师的指导,我用的就是 pharmacia 的 DEAE sephadex FF, 这是我借来的树脂,借出者说这个树脂需要处理一下,并告诉我用碱酸碱处理,但是我这样处理后,在碱下还很正常一用蒸馏水洗后变成了絮状,搅拌也不能使得泡沫减少,还是有很多树脂不能沉淀下来啊。

DEAE sephadex 并非是 FF 系列的,只有 DEAE-sepharose 才是,你的填料刚性差,流速不快,不过不需要酸碱处理,直接装柱平衡即可,气泡你放一些时间也会少的,上面有点填料也没关系,装柱子用就可以.我也没用过这些很老的填料,你问 GE 公司的人吧

楼主您好: 我想问一下, 实验指导上对各个型号的凝胶标注的蛋白范围(如: Sephadex G-50 应用范围: 1500-20000), 是什么意思? 如果我要分离的各个蛋白都在这个范围之内能否分

的开? 急!!

意思是理论上 1500-20000 分子量的蛋白都可以进入填料的内部孔,但是你蛋白都在这个范围也不一定就能分开,除非分子量差别很大,至少是 1 倍左右才可能分开,而且需要柱子够长,装柱子要好,看看常规的实验书,所以你还需要用离子交换柱子来分或者配合别的方法

色谱兄,我有问题向您请教。第一个问题:我的融合蛋白是 19KD,用 NI-NTA 纯化,现在我想除去咪唑,请问都有什么方法呢? 如果我用 G-25 需要多高的柱子呢? 如果是 Bio-Gel P-4,柱子需要多高呢? 第二个问题:我要得目的蛋白只有 1.9KD,我用的是 PET-32a 载体,目的蛋白和融合标签之间有肠激酶酶切位点,融和蛋白纯化出来之后,我想用肠激酶酶切,请您给我一个酶切之后纯化方案。说明一点:我的目的蛋白是含有二硫键的

1.可以透析或者过 G 25 ,Bio-Gel P-4 太慢,不用为好,柱子关键看你的体积,除盐柱不需要很长,10-20 厘米就可以,但是柱子也别太粗,1.6cm 直径左右就可以。2.切最好是直接在柱子上切,具体的方法你还是看一些相关公司的材料,这个我不很清楚

DNA 特异性层析,分离一未知转录因子 47KDa,活化的琼脂糖作为填料,请问你有什么建议,能发给我一常用的完整 protocol。

你可以买已经偶联好 DNA 琼脂糖凝胶即可,自己连很麻烦,有时候还不一定成功.如果你一定要连,可以选择 CNBr 活化琼脂糖凝胶即可,也可以参考你的那帖子里的书里就有

请问 chromatography, GST 琼脂糖凝胶 FF 柱一般能使用多少次? 使用谷胱甘肽溶液洗脱完后再用水洗然后保存在 20%的乙醇里,下次用缓冲液平衡后就直接可以用吗? 使用多长时间需要用 0.5M 的 NaOH 再生?

能用多少次关键看你再生情况和你的样品来决定,GST 琼脂糖凝胶 FF 本身的配基偶联是很稳定的,所以理论上如果不是因为核酸,蛋白,脂类和多糖等包裹住填料使配基不能暴露而结合目标蛋白的话是能一直用的,通常用上百次 以上应该没问题.所以样品一直要离心过滤,同时不能太浓,用过多次如果载量下降最好再生,所以再生关键看你的使用情况.如果载量没改变是可以脱完后再用水 洗然后保存在 20%的乙醇里,下次用缓冲液平衡后就直接可以用.篇幅有限,如果有什么问题可以电话联系,那样可以说的更清楚点

麻烦你,我想问一下 Q-琼脂糖凝胶 FF 和 Sp-琼脂糖凝胶 FF,不知道您是不是用过,我想分离植物中提取出来的蛋白,想分离分子量在 30KD 以上和以下的蛋白,不知道可行不? 上次你说到的 G75 之前也用过了但是效果不好。谢谢您了

分离纯化有时候是需要试的,如 30KD 以上和以下的蛋白,如果相差不多,那凝胶柱子也没办法,所以你还需要同离子交换或者疏水柱子去做纯化,离子交换选择 Q-琼脂糖凝胶还是 Sp-琼脂糖凝胶需要看你蛋白的等电点,所以是酸性蛋白适合用前者,反之用后者

GST 琼脂糖凝胶 FF 柱 1ml 和 5ml 预装柱的空体积大约是多少?

1 毫升没空体积可以连注射器和 AKTA 机器,5 毫升的有 7-8 毫升的空间

我分离蛋白质用的是 Tricorn 柱子装的 source15 Q 阴离子 填料，用了一段时间发现，分离效果没有以前好了，本来可以分开的峰现在都分不开了，而且柱子上部分填料，变成灰色的了，把填料做了一次认真的清洗，但是效果还是不好，是不是因为填料堵塞了？如果把 柱子重新装一下会有好的效果吗？那么把 source15 Q 阴离子 填料从 Tricorn 柱子拆分下来以后，需要怎么处理填料呢？

我觉得你的问题最好是问 GE 公司的,毕竟他们自己的产品更熟悉,我觉得填料不会堵的,主要还是杂质影响分离效果,你可以按他们的说明书做彻底清洗,重装怕也不能解决问题,,取填料不难,你可以把下口打开,然后用烧杯接找.再用泵往柱子里打溶液,这样就把填料冲出来了

我想问您一个问题

是用亚硝基修饰血红蛋白，想把修饰过的亚硝基血红蛋白分离出来做一下结构鉴定，反应物中可能没有反应的血红蛋白，我想问一下用什么方法可以把亚硝基血红蛋白分离出来。

这个我不清楚,你查文献看用什么方法去纯化就选择什么方法.如果实在没办法,你可以直接选择液质联用去做,用 HPLC 去纯化

我还想问下如果用 HPLC 的话用哪种色谱柱比较合适，选用什么洗脱液，血红蛋白上只加了一个 NO-基团，不知道用哪种比较合适。

反相应该没问题,你不需要自己做,找个能做蛋白分析的地方花钱就可以

我表达的蛋白是 GST 融合蛋白，蛋白比较大（约 150kd），经过摸索改变条件，（降低诱导温度以及 IPTG 浓度），仍然不能得到可溶性蛋白,蛋白以包涵 体存在，请教色谱兄，若是过柱亲和纯化，是否必须要复性后才能进行，能否破碎后用助溶剂溶解后直接上柱，另外，我用 SKL 溶解包涵体效果不好，有什么好的 方法溶解包涵体？

你可以用尿素溶解试试,有的时候相包涵体但是不一定没活性,也许蛋白本身疏水性强容易聚集,你可以在变性条件下上柱试试.溶解只能尿素等同时加点 DTT

你好，又来打扰您。我们实验室只有 G50，我想问一下，用它除咪唑，能不能分开呢？需要多高得柱子。我的融和蛋白是 19KD.谢谢

你可以试试吧,你这个填料也许需要装高点,至少也要 30CM 左右,上样先上 5-10%试试,不行就用透析的方法吧

楼主，你好，我是做脂肪酶分离纯化的，现在遇到的问题是，在我过离子柱的过程中，只能洗出一个蛋白峰来，我用的是离子梯度洗脱，选用了不同的盐浓度，但结果都是只出现一个峰，我选用的 pH 值是 9.0，望楼主给与指导，谢谢！

你是阶段还是线性洗脱,只有一个峰也许条件不好,麻烦你说清楚你用什么柱子,什么条件

chromatography 兄: 贵公司有没有涉足聚苯乙烯反相均粒填料方面的研究，例如 source 30,15

RPC,罗门哈斯的 XT 30 等

现在还没有,正做一些些细的填料.我们还是做生物大分子分离纯化的填料为主

请问 Butyl Sepharose® 4 Fast Flowh 的载量是多少?

不同蛋白和不同条件载量其实不一样,目录上说 7mg/IgG,26mg/HAS

chromatography 兄: 请问从细菌提取,纯化的蛋白如何去除毒素? 谢谢!

我只知道去内毒素,不知道毒素,如果是前者可以用去内毒素亲和填料去除,也可以用阴离子交换柱试试,如果后者不灵,只能用前面的.可以参考 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中的去内毒素亲和填料

chromatography 兄好: 我们实验室有些自己偶联 GST-agrose (买来活化好的胶),用来亲和吸附抗 GST 抗体,据说总共也就用过不到 20 次.最近用它拿来纯化 anti-GST 的 IgG,发现几乎不能得到目的蛋白了,我想是不是太多非特异性吸附,使目的蛋白不能结合上去,不知道能不能用 NaOH 清洗? 或者有没有可能是偶联的 GST 蛋白脱落,如果是,可不可以再次偶联,偶联前要怎么处理 agrose? (要不要用什么方法像 Ni 柱那样先把 现存的 GST 蛋白洗掉后再偶联)?

NaOH 清洗估计不行,你可以用 pH3 左右的缓冲液洗,然后再平衡试试,也可能是脱落,不知道你用的什么活化的填料,这些是不能重复用的,如果要做怕只能再买填料偶联了

您好,又来向您讨教问题了.融合膜蛋白的纯化,先过 flag 柱子,用磷酸缓冲液,pH,8.0,NaCl 150mM, 0.1%DDM,洗脱出来的条带只有 1 条比较明显的杂带.然后这个洗脱液直接过 amasham 的 Hitrap HP 1ml 柱子,用 50mMimidazole 洗,无目的蛋白,然后 100, 200, 300, 500mM,1Mimidazole 洗均有目的蛋白,(相同的磷酸缓冲液,pH,8.0,NaCl 150mM, 0.1%),跑 sds-page, 因为有 GFPuv 标签,荧光检测发现,洗脱出来的目的蛋白比上样时候目的蛋白少的多得多,然后检查了 flowthouth,也没有目的蛋白.然后用 uv 灯,照射柱子(此柱子已经用水,20%ethanol 洗过),发现整个柱子,只有上部发绿色光,就是说目的蛋白聚集在了柱子的上方.不溶?可是已经过了一次 flag 柱子了阿.我理解不了.您能帮我分析一下原因吗?接下来我该怎么办呢?谢谢您!

我觉得也许你的蛋白沉淀在柱子上了,所以下不来.膜蛋白不好溶解,你需要小心

谢谢答复,今天确定了,膜蛋白是沉淀在柱子上了.走完 flag 柱子的 fraction,该怎么处理,才能通过 his 的柱子呢?您有没有什么好的方法?第 3 条泳道是过完 flag 的后

最好是想办法让它溶解,如果你不需要活性可以考虑在变性条件下纯化,如果需要活性,那你需要改变缓冲体系,增加去垢剂的量或者类型使蛋白更好溶解,再纯化即可,你可以看看别的膜蛋白用什么溶解系统就可以

chromatography 兄: 你好,我是新手,现在做 GST 融合蛋白遇到了问题,我得蛋白一部分

表达在上清，一部分表达在沉淀，我想把表达在沉淀里那一部分用来免疫兔子，，但是不知道怎么处理啊，我要先用尿素把它溶解了，再过 GST 柱子 还是？对了沉淀里的融合蛋白能把 GST 标签去掉吗？

沉淀中有也许是破碎不完全,所以尽量用上清在天然状态下过亲和柱,因为 GST 融合蛋白如果 GST 部分没活性是挂不到亲和柱上,没办法纯化的,达到蛋白去免疫动物即可,[www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中有 GST 琼脂糖凝胶说明书你可以参考.去标签需要在构建的时候在 GST 和目标蛋白之间加入酶切位点,用酶切了才能去掉 GST,多看看相关实验书也许会更全面,实验更好做,也可以问问周围做过的人.没关系的,谁都是从生手过来的

我想问一下可否这样纯化血浆中的某蛋白，可以买到这种蛋白的抗体,能否在抗体上标记生物素或其他的东东,然后再用有生物素配体的柱子纯化。我在蛋白纯化方面不是很懂,重组蛋白与天然蛋白在结构上还是有一些差异,我想获得天然的蛋白,不知道有什么方法纯化吗

如果抗体便宜的话,那你可以直接偶联抗体到活化好的填料上,然后有它去纯化你的蛋白,但是 1 毫升填料需要 5-10 毫克的抗体,我担心抗体太贵就做不了了,抗体用生物素标记没必要

我想问问，我用 DEAE-A50 过柱提人血清 IgG 蛋白，介质再生时，我用高盐洗脱杂蛋白后，再次过柱时，我想问问需不需要再重新过碱，过酸，平衡？我应该怎样处理？

这个填料不能在柱子上做再生,需要把填料取出处理,你最好问卖给你填料的公司,这个填料很老,不常用，IgG 蛋白纯化最好选择亲和的方法。

那请问，我要从人血清中提纯 IgG 蛋白，应该用什么样的层析介质？

如果你只想得 IgG,那直接选择重组蛋白 A 琼脂糖凝胶亲和纯化即可,具体操作可参考[www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中它的说明书,里面有例子

那请问一下，我已经订了 DEAE-A50,挺贵的，这种介质的纯化效果是不是不好，纯度能达到多少？

这个填料很老,可以选择 DEAE 琼脂糖凝胶代替.当然你定的也能用，只是麻烦点.纯度能做到多少看你的工艺和操作,没办法预测,通常一步离子交换很难得到多高纯度的,别期望太高

非常感谢您的回复,您能介绍一下具体的方法步骤,或者给一个连接,我了解一下,谢谢

你去图书馆看看有关实验的书,详细的操作我也不好写给你,其实就是免疫亲和纯化而已.[www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 下的资料下载中的生物大分子分离纯化策略,填料选择指南等也有有一些涉及这部分的,你也可以参考

我会好好的看书学习的，我是那个借别人帐号发帖的新人，我们实验室是新成立的实验室，没有人给我太多的指导，不知道 chromatography 兄能不能推荐几本书或者是网站啊

书可以参考:<蛋白纯化与实验鉴定指南>、《生物工程下游技术》、《酶工程》、《酶制剂工业》

《生化实验方法和技术》,《蛋白纯化实验指南》,《生化制药学》,《药物蛋白质分离纯化技术》,《蛋白质纯化技术及应用》,《protein purification》等

chromatography 你好: 我已经把活化好的胶溶涨了, 但突然发现要偶联的蛋白沉淀了, 这个胶还能暂时保存等把蛋白表达出来后再偶联吗?

看什么填料, 总之这样会影响实验效果的, 所以没办法, 也许这填料就不能用了. 保险的话还是用新的, 做之前最好先看看自己蛋白在偶联缓冲液中是不是会沉淀

你好, 我是从动物组织中分离抗菌肽, 分离了一年, 因为我分离的蛋白要有杀菌的活性才行, 也就是抗菌肽, 可是用普通的琼脂平板法就是检测不到活性, 后来采用了琼脂糖扩散法, 琼脂糖扩散法很敏感, 你做过么? 可以对琼脂糖扩散法提点建议么? 加过样后有圈出现, 是抑菌还是蛋白扩散的结果?

抱歉, 这个我没做过, 我想你还是多看看文献, 建立好检测方法很重要, 否则没办法分离活性物质, 最好是选择空白做对照, 排除干扰。

我现在做纯化 变链素, 是一种细菌素, 变链菌产生的一种抗菌性多肽, 3kd—4kd. 测定活性主要是抑菌实验, 它可以抑制口腔中的链球菌包括本族细菌, 我已经做完抑菌实验, 证明我手里的临床株含这种多肽. 现在就是要纯化, 因为我是口腔专业的, 对蛋白这个领域实在是不懂. 我已经买了截留量 1000 的透析袋, 我已做的工作如下: 1. 培养细菌, 离心取上清. 2. 0.45um 滤膜过滤, 滤出液用等量氯仿萃取 (氯仿会不会影响活性?). 3. 萃取出来的, 用 6M 尿素溶解 (尿素是不是也影响活性? 如果不用尿素溶解, 直接透析, 硫酸氨沉淀?) 之后就不知怎么办了

你最好是查文献, 透析用处不大, 在这里, 除盐倒是可以, 你的样品可以先选择离子交换, 然后过凝胶柱子如葡聚糖凝胶 G25 分离, 氯仿萃取不知道会不会影响, 理论上也许会, 包括 6M 尿素溶解也难保证活性, 但是具体有没有影响只有做了才知道

Chromatography 您好! 我表达的是 GST- MetAP1 融合蛋白, 融合蛋白可以纯化出来了, 经过凝血酶切割后电泳可以看见 GST 和 MetAP1, 但此时两种蛋白都在 GSTrap FF column elution buffer (50mM Tris-HCl, 10mM reduced- glutathione, 8mM DTT PH8.0) 中, 通过超滤后以除去 elution buffer (经过超滤后还有少量的 elution buffer), 再在 GST 和 MetAP1 的混合溶液中加入 GSTrap FF column binding buffer (140mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, PH7.3) 以稀释 elution buffer, 在将 GST 和 MetAP1 的混合溶液过 GSTrap FF column 时 GSTrap FF column 吸附了一部分的 GST, 但就是吸附不完, 总有 GST. 想请教下您有没有什么办法让 GSTrap FF column 把全部的 GST 给吸附完?

有一些 GST 或者部分融合蛋白也许失去活性或者结合 GSH, 所以很难再挂上这个柱子, 你可以先挂上, 别洗脱, 直接在柱子上切, 这样可以避免这样的麻烦

chromatography: 您好, 请问如何测蛋白内毒素的量, 最简单有效的方法。

最常规而成熟的就是鲎试剂法, 别的我也不很清楚, 你可发到外面问问或者搜索网络试试

我想问一下重组蛋白与天然蛋白结构上的区别,我不知道如何去查,glypican3 有重组蛋白卖,也有抗体卖,我希望拿到血清中的天然蛋白,用抗体纯化价格太高了,我又不知道天然和重组的到底有多大的差别,还望帮助

重组蛋白与天然蛋白结构上的区别你换是问厂家,不同的东西是不一样的,抗体纯化如果靠买抗体是很难实现的,因为太贵

chromatography 兄,不在吗?帮帮忙,回答一下!我在做一个融合蛋白,亲和纯化后需要用肠激酶酶切,酶切完成后想用凝胶层析分离,我的融合蛋白分子量为 21kd 左右,目标产物 4-5kd,肠激酶 26kd,酶切掉的 Tag 为 16-17kd,请问这样是否可行?我用哪一种凝胶合适?另外,我刚刚查到“反应残留的肠激酶可以与胰蛋白酶抑制剂琼脂糖专一性亲和结合”,我们所使用的凝胶介质大多是以琼脂糖为基质的,这样是否就是说有肠激酶的样品不可以用这些填料来纯化

只用凝胶柱很难把肠激酶 26kd,酶切掉的 Tag 为 16-17kd 分开,但是你可以选择 G25 试试,如果你的目标产物正好在内水体积出来,别的都走外水体积那最理想,其实我觉得你最好直接在柱子上切,这样直接得到目标产物和酶,再用亲和纯化大豆胰蛋白酶抑制剂琼脂糖凝胶亲和去掉酶即可.虽然都是琼脂糖凝胶,但是连不同功能基团作用是不一样的

chromatography:您好!我看了您的帖子受益匪浅.我现在有个问题想请教您.我是个做蛋白分离纯化的新手,现在做一个课题:分离胰蛋白酶和糜蛋白酶.因为两者的相似性,我真的不知道该从哪方面入手了.由于条件的限制,我这主要用的是离子交换层析,效果不是很好.请您帮助

我听说也差不多是用离子交换,你需要仔细摸纯化的条件,没更好的方法,当然如果经费多也可以考虑亲和纯化

chromatography 兄您好:

我订的 Glutathione Sepharose™ 4B 预装柱到了,2ml 柱床体积,是 Amersham 的,打开包装后才发现柱子和我想像的完全不一样,类似于一个大的注射器,里面充满了液体,最底部是一个小圆柱,按照说明理解上面液体应该是保存液 20%乙醇,底部圆柱应该是需要的柱子,但是整个柱子好像是平放进注射器底部的,没有接头可以连接的位置?很奇怪,因为是第一次订预装柱,感到一头雾水,请 chromatography 兄给予解释,另外柱子使用如有其他注意事项也请老兄给予提议,十分感谢!

我不是他们公司的,所以对他们现在的这个产品不熟悉,我知道其实就是注射器改装的,我见过图,而且没流速控制的,使用你可以参考他们给的说明书,这柱子不连机器,手工操作.你可以直接问 GE 公司.如果没具体的材料也可以参考 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中的 GST 琼脂糖凝胶的说明书,里面有你需要注意的问题及操作.操作对同类填料都是通用的

大哥,不会如你说的那样吧,当初我订预装柱子的时候可是说明要连接到 AKTApriime plus 小型蛋白纯化系统的,如果只是简单的手工操作,未免也太让我汗颜了,好的,我打电话再问下,还是谢谢你的回复!

你现在有的只能手工做,也许当时没沟通好吧.反正不知道能不能换,不能你也只能手工做

真的是,由于时间赶的紧,就仓促订了,唉,怪自己,不过我想问下 chromatography 兄,手工操作和仪器操作差别到底有多大,因为我做的是粗提蛋白,按我的思路纯化后需要进行 N 端测序,手工操作可以满足这种纯化后操作的要求吗?还有一点需要释疑,手工操作只有一个独立的柱子,看了一些资料,除注射器外似乎还需要外界的一个泵,但是流速等怎么控制,是不是手工操作都不需要控制流速等条件?再次麻烦大哥了

你买的看来是重力柱,打开下口就可以流液体,不需要泵,亲和这样做也可以,只是需要手工收集,检测合并,我们通常会通过下面的接管子和旋扭控制流速,不过你买的好象是最简单的那种,所以怕是控制不了流速的,这样纯化也不一定就纯度不高,只是 GST 融合蛋白经常混有 GST,所以亲和纯化后你还得过别的柱子,如果你运气好没有它那是最好的,柱子使用的问题最好问 GE,毕竟谁的产品谁更熟悉

我现在做的就是从昆虫体内直接进行 GSTs 的纯化,目的蛋白就是 GSTs,现在还没有进行表达后的纯化,这样子进行手工操作柱子你觉得可行与否?

没问题

版主你好!我从一种植物中提取一种热稳定性较好的酶,现在进行纯化,问题是:色素太多影响过亲和柱,另外大部酶结合在细胞壁上洗不下来,我已经加了 Triton x-100,我该如何在不影响酶活的情况下除去色素,有什么办法能把酶更多的洗脱下来?谢谢版主指导!

色素是比较复杂的,也没什么特别好的去除方法,只能过柱子分离,如你可以过离子柱和凝胶柱子,然后再过亲和,至于提取过程的问题,我也不大清楚,会不会你破碎不完全,最好查查文献看这类蛋白的提取方法更好

各位高手,请教蛋白质生物活性有哪些检测方法,什么方法最好?

这个问题太笼统了,不同蛋白是不一样的,最好是查文献或实验书,那也需要指定某个蛋白或某类蛋白,否则没办法查

韦老师您好,貌似您以前在卓冠工作过?我们实验室浙理工生工所 05 年就用了你们公司的填料和柱子,最近买的琼葡糖 G-75, 100ml 装,上 FPLC 的,我的蛋白是 GST-融合蛋白,在柱凝血酶切过夜,然后 PBS 洗脱,2ml 样品上 FPLC,柱床 40ml,柱内径 1cm,流速 1ml/min,柱压 0.3Mpa,用 PBS 洗脱,从 UV 吸收峰来看没有出现分开的峰,而是连续出现 2 个峰,收集洗脱液后 SDS-PAGE 发现条带很淡,并且上面还有一些杂带,怎么解决呢

您好,我们实验室买了琼葡糖 G75 HP, 100ml 装,上 FPLC。请问这种填料使用后如何去杂质?如何在位清洗?用什么 buffer?我要用它分离 13kd 的目标蛋白,之前先上了 GST 柱,柱上酶切后洗脱,里面还有杂质 26kd 的 GST, 36kd 的 Thrombin 和菌体 110kd 的杂蛋白,请问上 FPLC 该如何配 buffer?我用的柱子是 10X500,准备填 10X400,流速 0.5ml?上样量该有多大呢?因为 GST 洗脱后的样品有 3mL,全上样会比较大,该怎么解决呢?谢谢

产品的应用最好直接邮件或者电话和厂家联系,这样更及时,清洗都有说明书,通常用 0.5M NaOH 洗 3-5 个柱体积即可,光盘或者网站下的说明书都有,你可以仔细看看,缓冲液可以选择 20-50mM pH7.0 的 PBS 或者 tris-HCl 缓冲液.上样体积在 2 - 5 毫升左右,所以 3 毫升应该没问题

那连续的峰也许就是分开的,你可以降低流速到 0.5 毫升,上样可以减少到 1 毫升,这样分离效果更好点,产品的问题请直接发邮件,这样不方便.杂带我觉得是没完全分开的原因

**Chromatography** 楼主: 你好! 我初次接触重组蛋白的纯化。我想请问分离、纯化有活性的重组 BMP2 和 BMP7 应当采用什么层析方法比较好? HPLC 还是亲和层析? 应当采用什么填料和洗脱液呢? 谢谢!

抱歉,BMP 是什么,麻烦你说清楚点.要想得到有活性的蛋白 HPLC 不是首选,能用亲和最好选择亲和

BMP 是 bone morphogenetic protein 骨形成蛋白, 又有译为骨形态发生蛋白。BMP2 和 BMP7 是 BMP 的亚类。我查到的文献中, 有 HPLC 纯化的 BMP 分子, 另外, 有用肝素亲和层析纯化 BMP3 的。虽然我也觉得亲和层析会好一些, 但是, 我还没有查到用亲和层析如何纯化 BMP2 和 BMP7。楼主, 麻烦您给我提点建议?

HPLC 做分析更多,做蛋白制备的比较少,肝素如果可以的话,那你可以查查这类蛋白是不是大部分都属于保守序列,特别是肝素结合位点部分,仔细阅读文献,你也可以先试试看,免疫亲和也需要抗体而且需要量不小,因此还是需要专门去查查文献,我没更好的建议,如果亲和不行,你只能选择离子交换和凝胶柱子也许常规的方法

**chromatography:** 您好! 我纯化了 GST 融合蛋白, 通过凝血酶切割后可以看见 GST 和目的蛋白, 超滤后换 binding buffer 后,我的 GST 结合效率不很高, 总有部分流穿(应该没有超过载量), 而放慢流速改观也不明显, GST 部分可能有变性和不变性两部, 该怎么解决呢? 倘若在柱上酶切, 同样以要经过凝血酶切割 18 小时, GST 以可能会变性, 这又有什么解决方法吗?

想去的比较好只能在柱子上切比较好,你可以不需要切那么长时间,对于变性的可以用盐酸胍彻底变性洗脱就可以.对现在的样品,如没更好的办法你只能试试凝胶柱

楼主你好:我所纯化的蛋白质大概是 90kDalton, 用 Ni-NTA 进行亲和纯化, 在 200mM 咪唑中洗下目标带.大条带去除的很干净,但是还有很多 35kDalton 左右的小条带,就是加大洗涤缓冲液的量还是如此,请您指导优化的实验方案

要用不同浓度的咪唑做阶段洗脱,可以参考 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中的镍琼脂糖凝胶说明书,里面有应用的例子.例如你用 20,50,100,300mM 做阶段洗脱试试

楼主: 我想问一下, 由普通的亲和层析填料怎样制作高效亲和填料! 方法和过程, 最好给个工艺让我借鉴一下, 谢谢, 着急, 在线等!

不知道你所谓高效亲和填料是指的什么,通常所谓的高效亲和填料我理解的是 5-10 微米的颗粒的填料,其中以硅胶类最多,你可以查高效亲和填料合成就可以,不同的配基活化方法是不大一样的,最好能具体点.难在这里给你个工艺,你查文献吧

我用 AKTA PURIFIER 100 和 1ml 的 HisTrap HP 来纯化 6His 重组蛋白,上样量 2ml,流速为 1ml/min,可是用 BINDING BUFFER 后出来大量蛋白,其后用不同咪唑浓度梯度的洗脱液 (50-500mM)洗脱都没有看到蛋白峰(紫外监控),我觉得是目的蛋白没有结合上,可以 把柱子取单独和上样液温浴一段时间嘛?具体该怎样操作?此外问题可能还出在哪里?我制备上清时是用 1g 湿菌加 5mlPBS,300W,超声 4s,间隔 4s,15-20min,是不是太剧烈了?样品有些粘稠,用 binding buffer1:2 稀释后上样

如果实验本身都没问题,建议换个颜色更深,配基密度更强的普通镍琼脂糖凝胶 FF 填料试试,当然也可以在变性条件下做

糖蛋白用什么填料亲和好呢? 含有 5 个 N-糖苷建

你可以查文献看看,关键是什么糖类,你可以查查,如果是葡萄糖等可以选择 Con A 琼脂糖凝胶等凝集素亲和填料,也可以选择硼酸琼脂糖凝胶

楼主, 请教您, 蛋白质纯化仪的蛋白缓冲液如何去配?

一般的生物化学实验书后面都有缓冲液的配方.如:《生化实验方法和技术》后面就有

请问 chromatography 老师:你能否告诉我非变性梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳具体怎么做?能告诉我具体的步骤和配胶的物质和有关的要求吗?我想分离一种蛋白的三种亚型(为三聚体\六聚体和高分子量形式)

很久不做电泳了,你可以去查有关蛋白电泳的实验书,那样很详细,只是好象要做梯度聚丙烯酰胺凝胶比较麻烦,你可以先不用梯度的试试

请问楼主: 1 我大肠杆菌 纯化蛋白, 但是纯化的蛋白中含有细菌内毒素, 我想做内毒素定量, 我查了可以用 LAL ASSAY 做, 但是我不知道是送到公司做还是可以在实验室自己做。

我不知道哪家公司有这样服务的,也许你还得自己做,只要有内毒素的标准品和鲎试剂你就能自己做,你也可以问问专门做内毒素检测试剂的公司试试,他们应该更清楚

Hi, I am doing protein purification from E.coli. the protein is a Histagged 31KDa recombinant protein. I use Ni-NTA agaros columns. my problem is my protein can not bind to the resine strong enough and when I was washing it lost in the wash buffer. what can I do?

也许你蛋白的标签暴露不很充分,如果没办法也许你得在变性条件下去做,用盐酸胍溶解样品,在变性条件下纯化,如果有条件也可以换个 ni-IDA 的填料试试.因为这类填料的作用力更强,配基密度也更高些

请问经过 DTT 处理，并结合了 SDS 的蛋白能否用来测 N 端序列，已知该蛋白是单链的

DTT 处理只是打开二硫键而已,测序不是这样的,如果只需要测定 N 端氨基酸,有专门的测定方法,如果要测序列,那也许你得交给外面公司去做,自己做不了

色谱兄:我目前纯化的是微生物胶原蛋白酶,在前期用硫酸氨沉淀之后再用缓冲液溶解,有十分严重的色素,近黑色.即使透析后色素也不能除去.对后期的纯化产生了十分严重的干扰.问题:我想除去色素,有什么比较好的办法吗?

我也没什么好办法,如果这样你只能过离子交换柱看看会不会部分挂不上,如果也挂上会不会是和蛋白结合的色素,这样你只能在分离中去除,没别的好方法.我 看书上有推荐用活性炭的,你也可以试试,一般加 0.1-1.5%,也可以试试一些脱色的树脂,还可以采用一些非常规的方法如有的色素如硫酸铵沉淀时加一些 亚硫酸氢钠能使一些沉淀颜色变浅,多试试吧,好运

你好，我刚表达好的蛋白，想做纯化，我想问一下，我不想用超声波破碎细胞，那么用细胞裂解液裂解后再纯化会影响蛋白活性吗？还有，我用 Ni 柱子试剂盒纯化，楼主用过吗？介绍一下经验可以吗？

没用过试剂盒,你先按说明书操作即可,有什么问题再讨论,通常纯化都可以保证蛋白的活性,特别是短时间的,你破碎和纯化都监测活性即可

请问楼主：我用 NI 柱（QIANG）纯化 pET32a 表达的蛋白，目的蛋白总是和一些杂蛋白分不开。听说有公司纯化 his-tag 标签的蛋白时是直接用的 his 的抗体做柱然后纯化，现在也想自己做个这样的抗体柱子，然后把两个柱子合起来过，请楼主指点一下制这种柱子的步骤、注意事项等等，或者能给个资料我自己看看。因为只是听说有这种纯化，但是网上查不到。

优化的问题我记得曾经有专门讨论过的,我觉得如果你样品处理不好或者表达时候有降解,那抗体纯化一样也不纯,何况抗体很贵,你还是用不同浓度的咪唑做阶段 洗脱,平衡缓冲液中可以加点土温,在咪唑洗脱前可以加一步 pH5 的洗脱,这样都会使背景更干净的,好运气. 免疫亲和很常见,只要你买活化好的填料如 CNBr 或 NHS 活化的填料偶连抗体,然后做柱子,洗脱用低 pH 洗脱抗原即可. 一般填料的说明书都有,你也可以问公司

请教您，我用 AKTA 系统纯化小肽，分子量约 6KD，请问我应该看 280nm 还是 215nm,谢谢

不知道你小肽结构如何,如果有苯丙氨酸,色氨酸等那 280 应该没问题,如果没有那就选择 215nm,AKTA 如果能开两波长的话也可以同时开对照

您好，还想请教您，昨天问您的小肽是看 280nm 还是 215nm ,我查了一下，结构中好像没有苯丙和色氨酸，如果看 215，出的峰要比 280 高的多，280 峰很小，可能与我的目的蛋白含量非常少有关，那我收集是否就可以只根据 215nm 下处的峰收集。谢谢

可以根据 215nm 下处的峰收集即可

我的蛋白体外表达，分子量大概 23KD，以包涵体形式出现。就量培养，诱导，超声破碎，

离心后,包涵体溶解在 8M 尿素溶液中,阶段透析至 2M 尿素。然后上 DEAE-SEPHAROSE,平衡液用 50mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0, 开始是梯度盐浓度洗脱, 摸出来大概在 0.4-0.5M NaCl 目标蛋白洗脱下来。现在我扩大培养, 出来了两个问题:(1) 超声破碎离心后, 沉淀在 8M 尿素溶液中无法全部溶解, 过夜溶解也不行。未溶解的部分呈一种暗褐色, 上 SDS-PAGE 后发现, 里面含有目的蛋白。不知是何原因? 实验室另外一个同学做另一个蛋白也发现这个现象, 未溶解的部分, 她改用盐酸胍, 就能溶了。请问这个是何原因?(2) 透析后的样品上柱后, 发现蛋白无法分离, 出来一个硕大的宽峰, 电泳检测发现和 8M 尿素溶解的样品成分类似。我这次是直接 0.4M NaCl 洗脱的。请问是什么问题?(3) 另外, 关于柱子, 一次样品处理后, DEAE 用高浓度 NaCl 冲洗后, 是否即用平衡液平衡? 还是每次均需用 5M NaCl, 0.5M NaOH 洗柱?(4) 我还有一根凝胶柱, Sephacryl S-200, 柱子装了有 2, 3 个月, 开始就平衡好了, 但一直没有使用。我现在准备要用的话, 是否需要重装? 或者做哪些处理?

1,怀疑破碎不太完全.2,也许没透析好,尿素过高,所以干扰分离.3,最好是.5M NaOH 洗柱清洗柱子一下.4,如果没长菌那可以平衡直接用即可

那有没有长菌如何判断呢? 如果长菌的, 要做怎么的处理?

柱子如果是装前的颜色, 没别的颜色那基本可以放心, 如果有菌那就麻烦了, 需要取出填料, 想办法去掉菌, 还需要碱泡, 再重新装柱, 染菌是非常麻烦的, 所以不用最好加抑菌剂或者灌满 20% 的乙醇

我刚装了一支 G75,但是就算加的是蒸馏水,其流速都只有 3 秒/滴,感觉是流不出来,这是什么问题,该怎样解决.谢谢

这个填料是这么慢,每分钟差不多也只流 0.5 毫升左右,没办法解决,填料本身软,只能慢慢用.要不就换填料

我最近作这方面的试验了, 买了法玛西亚的葡聚糖 cm-c25 阳离子交换剂, 但是不知道如何使用阿, 连说明书都没有, 谁能提供给我一个说明书, 最好是中文的。或者是谁知道就在这里告诉小弟吧

买谁家的就问谁家要材料即可,这个填料很老,抱歉没什么材料,不过很简单,只要用缓冲液溶涨过夜,装柱,平衡后就可上样,现在用的比较多的还是 CM 琼脂糖凝胶类的填料.刚性更好,流速也快

sephacryl s300 能分开白蛋白和 IgG 吗? 个人觉得应该是可以的, 两个的分子量相差还是挺大的 66k 和 150k, 但为什么我总是分不开, 2.6X60cm, GE 的产品, 1.5ml/min

这个填料分离范围太宽了,上限可以到 1500KD,所以你选择 100 或 200 都可以,也许 100 会更好点,你要少上样,1-5%试试,流速慢点,如果还分不开,那就没办法了,白蛋白和抗体有的是好的办法,如苯基琼脂糖凝胶,0.5M 硫酸铵白蛋白挂不上但是能挂 IgG,也可以选择蓝色琼脂糖凝胶或镍琼脂糖凝胶都可以特异吸附白蛋白,而且 5 毫升左右就可以处理几毫升的样品,比凝胶柱便宜而且效率高,因此最简单的方法未必是最好的方法.好多人觉得亲和贵而我得

和凝胶柱比如果能用亲和,那是最合算的方法

chromatography 兄,您好!有几个问题想要麻烦您。我用 clontech 的 NI 柱纯化表达的蛋白,按他们的手册操作,能结合的蛋白量不是很多,大概 2mg/ml 柱,洗脱下来的小于 1mg/ml,不知道这个量是不是很不合理,因为他们公司称结合能力可以达到 5-20mg/ml。请教是不是柱子有问题?还是该如何优化条件?另外我想纯化克以上的量,有没有便宜点的填料,纯化一克需要多少钱。谢谢您!

不同蛋白载量不一样,但是 clontech 的是不是螯合的钴离子,如果是蓝或绿色的是镍离子,如果是粉红色的是钴离子,我记得以前他们的是钴离子的,钴离子作用力弱,载量不高,换成镍的也许好点,但是它们是四价螯合的,不如普通镍琼脂糖凝胶三价螯合的载量大,所以你要想载量高,只能换这样普通的镍琼脂糖凝胶更合算.优化估计意义不很大,你可以多上点样,降低点流速试试

您好,因为我以前是做分子生物学的,现在由于课题需要要做蛋白纯化。一定经验都没有,也没有多少理论知识,所以很是迷茫,可以推荐一些实用的资料吗?谢谢啊。因为我急做。(我现在连样品前处理都不知道怎么做,我是 HIS 标签和 GST 的,现在买了阿马西亚的预装柱。)

你可以参考 <分子克隆> 中的相关章节,也可以参考这里 [http://wolfson.huji.ac.il/purification/extraction\\_and\\_clarification.html](http://wolfson.huji.ac.il/purification/extraction_and_clarification.html),纯化的操作可以参考 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中的 GST 和镍琼脂糖凝胶说明书,里面也有溶液的配方,包括注意事项.填料都差不多,所以说明书可以互相参考

这几天小弟我一直在过柱子,就是 cm-c25 阳离子柱,为了分离一个 ph8.25 的碱性蛋白。过程是这样的:先用 0.02M 的 PBS, ph=7 平衡柱子,然后开始加样品,大约 0.5~1.0ml,然后继续用改 PBS 洗脱,结果出来两个峰,然后等稳定后用 0.2M 的 NaCl 洗脱, ph=7,结果什么都没有洗脱下来,然后继续用开始的 PBS 洗脱,结果就出来一个峰。大家帮我看看到底这是怎么回事啊?!正常来说应该是低盐吸附,高盐洗脱,现在还没有确定着 3 个峰到底是什么,但是为什么最后用低盐还能洗脱出来一个峰呢?就是这里不明白了,再说高盐没有洗脱出来,可能是样品里没有目的蛋白。

每个洗脱峰电泳检测或者活性检测,看目标蛋白在哪里,此外平衡缓冲液改成 0.02M 的 PB 这样更好

您好!很多次打扰您,我想用预溶胀的 DE-52 纤维素纯化蛋白,但是没有说明书,该怎么用?溶胀体积是多少?上样量多大?

加缓冲液泡过夜装柱子即可,1 克加 5-10 毫升缓冲液.上样按 10-20mg/ml 即可

我也有个问题请教,请问我纯化蛋白后跑 SDS 蛋白电泳,我要的蛋白分子量大约 20KD,但在 22KD 左右有一条比目的蛋白还清楚的条带,我想请问是什么原因?

电泳的事情我也不很清楚,有杂带是正常的,至于是什么东西,那我不清楚了,也许你需要用

WB 看看是不是也是你的目标蛋白,因为有时候预测的分子量不一定准确,或者电泳也是有误差的,也许浓的才是你目标蛋白也不好说,所以你需要鉴定

我用的 1\*30 的层析柱, 上样量应该多大? 浓度多少?

凝胶柱子都会使样品扩散,所以你上样时候高,到出来的时候吸收值小是很正常的,要不你就浓缩样品,这样也许好点,上样多少看你的目的,如果是除盐可以上到柱体积的 20-30%,如果是分离<5%.浓度多少也看你的分离效果,没确切的数值.总之适合自己的就好

您好! 我用缓冲液浸泡预溶胀的 DE-52 过夜之后, 体积没有多大变化, 5 克多大概也就有 10 毫升左右, 正常吗? 还有我想装一个 1.6\*30cm 的柱子, 得要多少克胶呢?

很正常,你需要 40 克左右的纤维素,建议用 DEAE 琼脂糖凝胶代替这填料,因为它太老,流速慢,不能在柱子上再生,很难用

可以说一下怎么再生吗? 因为我现在只有这个胶, 就是说每次用完都得重新溶胀? 流速是 1mL/min 吗? 非常感谢

再生看说明书吧,这填料我也没怎么用,需要取出填料用碱处理,和新开始差不多,倒不需要溶胀,但是需要把填料取出来再生

色谱兄:再请教下很菜的问题:我用的是强阴离子柱:在过柱过程中,对缓冲液的离子浓度有什么特殊要求没有?我用的是 20mM Tris-Hcl,50mM CaCl2.离子浓度是不是太高了.另外,我做的是个酶蛋白,pI 未知,那么对 pH 有什么特别要求吗?

没特别的要求,主要还是看你蛋白本身特性来决定,可以按文献做,20mM Tris-Hcl,50mM CaCl2 你可以试试能不能挂上,挂不上再降低点 CaCl2 浓度.等电点不知道只能试,不好说,你可以调 pH 到 7 试试.偏碱钙离子会沉淀的

chromatography:您好。我还是做以前的那个课题。就是纯化一个蛋白, 等电点为 8.67。我选择的工艺路线是 盐析----疏水层析-----超滤脱盐-----sp 离子层析。sp 离子层析条件是: 上样样品的电导在 10ms 左右, pH7.6;缓冲液 A : 20MMOL 磷酸钠缓冲液, pH7.6; 缓冲液 B: 20MMOL 磷酸钠缓冲液, 1N NAcl pH7.6;洗脱条件: 从 0%B 到 50%B 10 个床体积 现在附上最后 sp 离子层析的电泳图 (1 是上样: 2 穿过; 3 4 5 6 洗脱) 我发现 目的蛋白下面有 3 个杂蛋白, 从结果来看, 它们 和 我的目的蛋白 电荷性质很相近 下一步 我该怎么做呢 (今天我还把 SP 洗脱下来的收集液脱盐后调节 pH 到 8.0 上 DEAE 柱 可是没有效果) 老板说纯度要 98% 以上 我好着急啊

根据你蛋白的分子量和杂带的位置你再过一步凝胶柱子也许会好点,,当然你也可以优化你的离子柱的条件,用阶段洗脱,在目标蛋白出来的位置做精细点,也许比线性洗脱好,或者线性洗脱做 20-30 个柱体积再试试,还可以换 HP 级别的填料,这样更好,柱子需要装细长的

小弟下午要第一次做硫酸胺沉淀, 但翻了很多书却毫无头绪, 希望 chromatography 大哥哥能给个具体的实验方案和流程, 小弟在线急等!

我没这个操作方法,你可以到图书馆查有关生化的实验书,其实很简单,你先要建立检测方法,然后实验不同硫酸铵浓度得到的收率和纯度等,这样就可以选择合适的浓度即可,实验都需要一边做,一边修正,没确切的方案

请问楼主,我做的蛋白上柱后(his)不用咪唑就能洗脱掉,是不是蛋白已经没有活性了

不一定,需要检测活性才知道,这应该是吸附力弱的表现,和活性没关系

你好,我现在要纯化病毒,做过超速,又过柱子 sephrose 4 FAST FLOW,但是结果还是不理想,用 ELISA 检测发现阴性血清的 OD 值偏高。包被板子不加血清的孔值也高。很头疼。上次用同样的方法效果还不错,这次过柱子不知怎么就不好。如果再过一次柱子是不是会好?因为这次过柱子时只发现一个峰,感觉没有将里面的蛋白和病毒分开。

sephrose 4 FAST FLOW 也许孔径偏大,可以选择 6BFF,这样也许更好,或者把柱子加长,少上点样品,流速慢点,还可以把柱子清洗一下再试试看

我现在马上要做磷酸化蛋白质组学方面的课题。就是将经过药物刺激后的肝细胞和对照组富集磷酸化蛋白然后进行 2D 找出差异,以及 MS 鉴定。打算用 IMAC,可没什么经验,不知道到底用哪种金属(Fe 或 Ga),还有填料柱子等从哪里可以购得?我知道有试剂盒,可如果很贵的是不是可以自己做替代呢。我想请问您在 IMAC 方面,以及 DIGE 方面的一些经验和相关资料。谢谢!

通常选择铁离子的就可以,其实填料很简单,你用 google 搜索镍琼脂糖凝胶,用 EDTA 洗掉镍离子,然后螯合铁离子即可,操作方法见 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中有磷酸蛋白的纯化方法。材料已发,以后别在帖子里留邮件。我觉得买试剂盒比较贵,买填料应该比较经济

chromatography 兄:能推荐一个适合用于氯仿,甲醇等溶剂纯化的阴离子填料吗,以前我用 Q-Sepharose F F,但感觉对填料有损伤,而且极难进行清洗再生。用 DEAE A-25 系列又载量太低,谢谢赐教

甲醇用于 Q-Sepharose F F 应该没问题,氯仿就不好说了,特别对一些管道都很难承受,所以你最好还是先选择好柱子肯能不能耐受再说,别的填料那就是硅胶类的填料肯定没问题,不清楚为什么需要在这样的溶剂中做,那怎么洗脱呢,在这样的溶液中盐也难溶解,你还是看文献怎么做的吧

我的 DE 柱子上样量太大了,一直洗脱不了,就是 A280 一直在 0.3 以上,还没开始梯度洗脱,问您一下,晚上我可不可以先停了,明天继续洗脱阿?

加快流速冲洗,此外如果一直下不来,那建议换盐开始梯度,因为也许有的时候色素干扰,不一定就是蛋白

糖蛋白一般用什么填料吸附比较好啊?做初步的分离纯化?另外超滤管,比如 90kd 的蛋白能否用 100kd 的超滤管做初步的分离呢?效果如何

当然比较好的方法是亲和，你可以查文献看看，粗分的话那也可以选择离子交换，超滤没有100kd的超滤管吧，很难实现。还是过柱子比较好

请问楼主，我前几天纯化一个蛋白，分析结果显示此蛋白的等电点在6左右，我用PH8.0的Tris缓冲液溶解挂5ml Q FF的柱子，发现没挂住，换成1ml SP FF的柱子也没能挂住，不知道哪里出了问题。在上柱之前我也进行了离心，沉淀几乎没有，而且跑电泳和作活性分析都证明我的蛋白确实存在。我的蛋白是细菌表达的，比较耐热，在上柱前我用加热的方法去除了一些杂蛋白，不过我的目的蛋白是可以耐受此种处理的。请楼主帮忙分析一下可能存在的问题，谢谢

等电点有时候不一定准确，你可以提高pH到8.5-9试试，纯化是个比较复杂的过程，所以我觉得只能多试试各种方法和条件，加热除杂蛋白是好方法，但是有些低浓度的而且稳定的难去掉，所以还是要找个条件离子交换粗分后再过凝胶柱或者别的方法使得更纯

我现在要纯化的目的蛋白分子量约16万，但是经过亲和层析，离子交换层析，疏水层析后仍有一条分子量约11万的杂蛋白，请问有何方法能分离这两有蛋白？谢谢！

我觉得也许你的杂蛋白是降解片段，所以要注意样品本身处理的问题，每一步纯化不同的条件其实是不一样的结果，所以你也可以细致优化一下纯化的条件，当然实在没办法也可以试试凝胶柱，但是最好选择高分辨率的填料为好，而且分离范围要窄点

我用pet-32a载体表达的融和蛋白分子量19KD，我的目的蛋白只有2KD。下一步打算用肠激酶酶切。1:请问酶切之后我该如何纯化才能得到我的目的蛋白。说明：我的目的蛋白等电点是8.4。融和蛋白等电点是5.88。2:我想到两种方法：一是酶切之后直接过Ni柱，这样我要的目的蛋白直接在穿透液中，只是会混有少量的肠激酶。二是用sephadex G50纯化，要把2KD,17KD,26KD的蛋白分开，请问得灌多高的柱子。3:我得到的2KD的蛋白如何进行浓缩呢？我的目的蛋白是含有三对二硫键的。4:我初步测融和蛋白是有活性的，我想不酶切。直接用融合蛋白测活性，然后空白载体表达的蛋白做对照，这样是不是可以呢？我老板想让我发SCI文章的，这样测得融和蛋白活性能不能发SCI？

1-3,可以直接挂镍柱的时候洗完杂带，直接在柱子上酶切，这样方便而且效果好，不需要分离，也可以选择直接过G25的除盐柱子，这样可以得到小分子的肽，浓缩可以冷冻干燥。柱子不需要装太高10厘米左右足够。4发表文章的事情我不很清楚

看完你们的分析，真是茅塞顿开。我们做了鉴别实验，的确是两条带都有特异性结合，但是依然想把第二条带去掉，哪怕是牺牲一些收率，我们想买一种凝胶填料试一试，请你推荐一下，象Superdex, Superose, Sephacryl, Sepharose FF, Sepharose, Sepharose 这几种凝胶，使用哪种比较好，我们要分离16万和11万的两种蛋白，以前做过G-50, G-25效果不是很好

Superdex75可以试试，别的分离效果一般而且也不合适，但是即使如此，我觉得也很难，因此建议你好好去摸索前面的纯化步骤，否则怕你白费钱。亲和可以选择不同浓度做阶段洗脱等，总之不优化是难得到好结果的，也需要注意样品本身的问题

又要麻烦 chromatography 老师解答了。我准备买 GE 的 XK 的空柱一根。以前一直用预装柱和国内厂家的空柱。看产品目录似乎是说这种 XK16/20 或者 16/40 的柱子可以接两个 Adaptor,例如上面介绍到,16/40 柱子一个 Adaptor 时 45-70ml 可调,两个 Adaptor 时 16-70ml 可调。这柱子真是可接两个 Adaptor 吗?我目前主要想装一根 superose 6 的柱子,做分析和小量的制备用,填料有。另外还发现有些离子、疏水的填料,想着以后可能的也能用上。谢谢

可以接两个 Adaptor 没问题,你如果有两根同样的柱子把其中一个 Adaptor 也移过来一起用试试就知道了

韦兄你好!这里请教一个 HPLC 的问题。TSK3000SW 不知道韦兄是否了解?我查它的分离范围 4,000-900,000,但是我们的一个蛋白约 85kD,它降解后有一个 65kD 的片断。当电泳明显可以看到降解时,HPLC 出来还是一个峰。而且把完全降解的蛋白和好的蛋白混在一起出来还是一个峰,不知道个中原因,望韦兄能指教。

因为你选择的柱子 3000SW 范围太宽了,最好分离范围窄效果更好.当然你也可以选择反相柱来分离,如果你只是分析的话

我对 HPLC 确实是外行,不知道反相柱的作用原理是什么?还有,假如给出一个蛋白(可能并不知道是否含有杂蛋白、含多少、更不知道杂蛋白的性质),如何来选择 HPLC 柱进行纯度分析?根据掌握的目的蛋白的性质(等电点、分子量、疏水性等等)会有怎样的帮助?

反相是根据疏水性分离的,分辨率高,做分析是最常用的手段.凝胶柱子效率不如它

请问谁用过凝胶 G100?您用的时候感觉 G100 稳定吗?是不是每用一次就得重新装一次柱子?我的目标蛋白分子量在 80KDa 左右,请问还有更好的分离纯化方法吗?谢谢指教!

还算稳定,不需要每次重新装柱子,但是这个填料流速很慢,建议选择刚性更好的填料,你需要知道杂带是在什么范围,只知道目标蛋白是不够的,查文献看看,建议开始最好走离子交换,这样处理量大,凝胶柱很难把很近分子量的蛋白分开

求救 chromatography 兄:我纯化的蛋白纯度已达 98%,但残留宿主蛋白不合格。按新药申报要求,残留宿主蛋白不能高于总蛋白的 0.1%。请问,我该采取什么方法去除残留宿主蛋白。先谢了!

我觉得你可以根据你的目标蛋白和杂带选择过合适的凝胶柱子去纯化,也可以在纯化工艺上监测这样要修正你的工艺.没确切的方法,只能试。曾经做过一个类似这样的过了琼葡糖糖凝胶 G200 HP 柱就好了。

我想请问一下小分子蛋白的凝胶层析,有哪些缓冲液可以用?我的样品的分子量大约 1000—20000Da,所以想先用 Sephadex G50 并结合短而粗的柱子尝试看看,但是不知道该选择什么缓冲液

PBS 就可以.柱子短效果一般,最好长点,至少也要 40cm 以上

请教楼主 为何做 GST 蛋白纯化时，上样用 PBS 缓冲液，洗脱却用 Tris 缓冲液?可以用同一种缓冲液吗?

可以，用 Tris 缓冲液是因为它缓冲能力更强，加 GSH pH 不容易改变。

既然如此,为何所有的方案都是用 2 种不同的缓冲液呢? 洗脱时 tris 缓冲液有什么优势吗?

Tris 缓冲液缓冲能力更强点,其实不用它也是可以.用同种缓冲液也没问题,各家写说明书不一样而已

我先前已经用离子交换层析粗分离了蛋白,得到的收集物还有部分杂带,分子量大概十几 KDa,而我想分离的目标蛋白分子量约 80KDa,所以就选用了凝胶层析法,填料是用的 G100,但是感觉柱材很不稳定,跑一次后柱材就积压的很紧,不重装柱子就跑不动了。您建议的刚性填料是指什么呢? 我是刚刚接触分离纯化的,对这些填料还不懂,请您指教,谢谢!

如果这样,那是你流速太快,所以填料收缩,你的用 G75 就可以,刚性好的填料有不少,你查一些有关填料选择指南就有,所看看材料,例如 superdex 75 或琼葡糖凝胶 G75,100 等,刚性强,而且体积不收缩,这样流速快.

你好,我想问一下,如果我组织抽蛋白,发现有降解,但又不知道是哪个组织有降解,用什么方法可以知道呢??

这个很难说,没什么好办法,你只能加一些抑制剂,降低温度,尽快处理也许会好点

chromatography 老师你好: 我想问你 phosphate saline buffer 和 phosphate buffered saline 是一回事吗,我看文献上我要提取的蛋白是用 phosphate saline buffer 75mmol/l pH7.4 溶解样品,我该怎么配制啊?

应该是一样的,你找实验书看看,我直觉觉得应该是磷酸盐缓冲液,你可按磷酸盐缓冲液配就可

30mmol/l Sodium phosphate buffer 又是指什么呢?

30mM 磷酸盐缓冲液

请问在北京有没有做蛋白提纯业务的公司呀?

我们可以做,我觉得如果不复杂最好还是没填料自己做的好,特别是重组蛋白纯化,通常好的公司都会指导怎么做的

我想购买亲和填料,不知道楼主能否给予好的建议,国产的可以的,兰色葡聚糖凝胶。此外,如果购买 1ml 的预装柱,做预试,收集的样品足够用来做高效液相色谱 (HPLC) 吗?

蓝色葡聚糖不是填料,是可溶解于水的,而填料在水中不溶解,你该选择蓝色琼脂糖凝胶填料,对 HPLC 而言,1 毫升的柱子应该就可以

请教一下(我没怎么做过纯化,有些外行,见谅!),有没有比较强的吸附材料能非特异的吸附蛋白,并且能比较方便的洗脱呢?有没有这样的吸附材料在低温下具有较高的吸附能力,室温吸附能力就很低呢?它们能在较高的尿素影响下效能不发生较大改变吗?

这个不很清楚,不同蛋白特性都不一样,所以很难找到这样的材料,而且即使有,那也什么都吸附,不会只吸附蛋白,大多吸附都是高温作用力强,低温作用力弱,但是也都有范围

楼主麻烦问一下,我在做 HIA\_TAG 纯化时,strip buffer 中的 EDTA 用了 EDTA.NA .2H<sub>2</sub>O 代替,会对纯化有影响吗?

抱歉,不知道什么叫 HIA\_TAG,是不是 HA\_TAG。EDTA.NA .2H<sub>2</sub>O 代替是可以的,只要 pH 一致即可

chromatography 兄: 请问一下,我用 DEAE Sepharose fast flow 纯化一种未知天然蛋白,等电点可能在 5--6 吧,我用 pH7.5 的 Tris 缓冲液,但是蛋白都没有挂上去,我应该提高 pH 值?

可以,试试 8 或 9,此外留意样品的盐和 pH

楼主请教一下,硫酸铵盐析后的蛋白准备上 DEAE Sepharose fast flow 层析,需要脱盐吗?谢谢

当然,否则挂不上

我用 DEAE sepharose fast flow 纯化纤维素酶,样品含有色素,过柱后,用 0.5M NaOH,醋酸和 1M NaCl 清洗柱子,都没有办法将填料洗成原来的白色,目前填料已经变成浅黑色,我担心其性能会有很大下降,请问有什么方法可以清洗填料?谢谢

没特别好的办法,只能酸碱洗,包括用 70%乙醇洗,如果回不来,那也只能这样,所以样品一定要过滤,同时浓度别太高.如果色素过多,最好想办法去一些,可以搜索以前的帖子里面的一些去色素的办法

我是一个初学者,我想查一下蛋白纯化的一系列资料,请高手指点

还是去图书馆看看有关蛋白纯化的书,在这个帖子里也有列出的参考书,你可以翻回去查查看, [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载下也有一些中文的材料

我想请问一下,amersham 的 Ni sepharose 6 fast flow 再生的时候是按照说明书上的步骤吗?先用 5 倍体积 20mM sodium phosphate, 0.5M NaCl, 50mM EDTA, PH7.4 洗涤,再用 5 倍体积 binding buffer 洗和 5 倍体积蒸馏水洗,然后用 0.5 倍体积 0.1M 硫酸镍挂镍。左后用 5 倍体积蒸馏水和 5 倍体积 binding buffer 洗涤后就能放在 20%乙醇中保存了。可是我找这个方法再生完以后,填料的颜色变成了很浅的绿色,而不是新柱子的那种蓝绿色。我到 amersham

的网站上想找更详细的 protocol, 可是官网上也是这个。我想请问一下, 这种柱子的洗涤方法是要像 Ni-NTA 那样在挂镍前用盐酸胍及不同浓度的乙醇洗涤吗?

你可以先不管颜色的差别,你先做纯化试试,如果没问题就可以,当然用盐酸胍及不同浓度的乙醇洗涤也可以更彻底,也可以试试. 我们的填料大多是蓝绿色的,我想浓度高也许是发蓝的,低就发绿,所以整合时间最好长点,或者放一段时间,这样效果更好

亲和层析分离纯化乙肝多抗:山羊血清先硫酸胺沉淀,然后过亲和层析柱(CNBr-sepharose 4B,接有乙肝表面抗原),用 3M KSCN 洗脱,pbs 透析后浓缩,接 hrp(roche 的酶),用该酶接物检测乙肝表面抗原国家 penal,但 ELISA 检测结果中,国家 penal 中灵敏度这各 标准品 OD 值总很低,增加酶浓度,还是很低,达不到要求(说明酶接物活性低).现在怀疑抗体在分离纯化得过程中有配基(乙肝表面抗原)脱落,形成抗原抗体 复合物,而影响检测灵敏度.试问,怎样去除抗体中的脱落得配基,以及如何避免配基脱落?有那些因素会导致配基脱落? 1.分离出的抗体效价很高,( 1mg/ml,1:10000 稀释,测效价,OD 值 为 0.8),正常情况下,这么高效价的抗体接酶,接出的酶质量会很好. 2.hrp 酶,是 roche 的,质量很好. 3.接酶.采用经典的过碘酸钠法,最后用 50%饱和硫酸胺去除游离的酶.接酶时同时接另一批抗体做对照,因此接酶操作造成的原因基本可以排除

乙肝表面抗原不知道是不是聚合物,如果是的话,那么洗脱用的 KSCN 能把它亚基分开,这样脱落是有可能的,所以也许你猜测是对的,你可以降低 pH 洗脱试试,不知道能不能好点,还有那也许是偶联的时候抗体没保护好,这也是应该留意的问题,总之需要排除然后再解决

谢谢你的解答!不过还有一点没有弄明白,你说的 :还有那也许是偶联的时候抗体没保护好,-----是指我用抗原耦联柱的时候还是指我上样品过柱时? 谢谢!我说的偶联是指酶标抗体时的条件. 两次做完纯化跑胶后反而没有目的带了, 纯化前还有! 这是为什么? 我的纯化步骤如下: 结合步骤: (1) 200 mL IPTG 诱导的菌液在 4 °C, 8000 r/min, 离心 10 min, 用 10 mL (1/20V) 冰浴的 PBS 重悬沉淀, 超声波充分破碎. 加 1ML 的 TRITON-100 轻摇 30MIN, 12000 g 离心 10 min,取上清。(2) 加 200  $\mu$ L 50 % Glutathione Sepharose 4B 悬液, 轻摇 30 min。(3) 500 g 离心 5 min, 使胶沉积, 去除上清。(4) 用 3 mL PBS 洗涤 Glutathione Sepharose 4B 胶 5 min。(5) 500 g 离心 5 min, 使胶沉积, 去除上清。(6) 重复步骤 4 和 5 两次, 共洗涤 3 次。洗脱步骤: (1) 加 100  $\mu$ L Glutathione 洗脱液洗脱, 轻轻混匀, 使胶重悬, 室温 10 min, 使融合蛋白从胶上洗脱下来。(2) 500 g 离心 5 min, 使胶沉积, 将上清转移至一新离心管中。(3) 重复步骤 1 和 2 两次, 混合 3 次的洗脱液。

填料太少,加到 1 毫升试试,洗脱体积过大,只用 2-3 倍的洗脱 2-3 次即可,浓度太低自然电泳跑不出. [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中有类似的操作你可以去参考.此外可以取没洗脱前的填料清洗,加 2-3 倍电泳上样缓冲液,煮后离心取上清跑电泳,如果没目标蛋白说明没挂上,那洗脱自然就没有.盐酸胍洗涤没问题

请教一下, 分离纯化后的天然蛋白, 经过冷冻干燥后, 造成很大的损失, 可能的原因是什么? 怎么能尽可能减少损失, 保存蛋白活性的情况下, 进行溶液的浓缩?

不明白,你说的损失是量上的还是活性的,量上那比较正常我觉得可以用小点的容器,活性的话可以加甘露醇等做保护剂,浓缩多少都会有损失,但是量越小损失越大.如没必要可以不冷

冻干燥,透析袋浓缩后冷冻保存也可以,但是这样还是会有损失的

我们现在给本科生开的生化实验,走凝胶柱用的是 Sephadex G—75 凝胶,这种凝胶它的使用期限是多久啊?有哪些情况会引起它的损坏啊?如果是几年前回收的(干粉)现在用时只需要沸水浴几个小时就可以了吗?第一次带试验不懂的很多啊

只要颜色没变,那就没问题,沸水浴一两小时即可

请教色谱兄,最近在纯化两个 his-tag 蛋白,都是膜蛋白,采用盐酸胍梯度复性的方法在 Ni-NTA 柱上复性洗脱,之前曾经成功的收到了一批蛋白,但是现在同样条件下蛋白无法洗脱,换了新的填料也不行,除非把洗脱的 buffer 的 pH 值调到 3.0 才能检测到大量蛋白被洗脱下来。这是为什么啊?

这我也不很清楚,我猜测还是结构不一样,或者因为浓度太高,总之是条件和以前不一样造成的,你自己排查一下看什么因素

本人是菜鸟,刚开始做蛋白分离纯化,我想从分子量 16kd, 11kd, 6kd(大约值)这三个蛋白中分离 6kd 的蛋白,想用 sephadex G50,柱子规格:直径 16mm。长度 100mm。可行吗?如可行请指教一下上样量多少合适如何选者洗脱用的缓冲液(这三种蛋白是经过粗品水提提,再用乙醇从水中提取,挥干乙醇得到的),流速多少最合适。如不行,请指教一种可行的方法,万分感谢!

看看<生物化学实验方法和技术>等实验书中都有有关凝胶柱子的操作,实验有时候很难预测,只能做了才知道,我觉得你还是先用离子交换分完再上凝胶柱的好,因为不一定能分开,凝胶柱子和填料都没问题,缓冲液可以选 P B S 即可。上样 5-10 毫升,好运

chromatography 兄!可不可以给我推荐一下 GST 胶啊!我没买过,这几天用实验室以前留下的老是提不出蛋白。我提蛋白作单抗用!先行谢过!

有钱可以选择进口的,也可以选择国产的, [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载下有你想要的材料

chromatography: 我做 GST 亲和层析,大肠杆菌裂解液上清明显含有融合蛋白(做过 SDS-PAGE),但为什么就是挂不到柱子上。我重复了 4 次!结合 buffer 为 PH=8.3 的 Tris,0.9% 的氯化钠,感觉融合蛋白没有结合到柱子上,而是全部穿透了。但是有一些小分子量的杂蛋白结合。难道使用不同的缓冲液对蛋白的结合影响很大吗?(文献上用的是磷酸盐 buffer,我用的是 Tris buffer。)表达所需要的质粒是我问老外要的,为什么就是纯化不出来,郁闷!

不会有太大的差别,你可以看看说明书,破碎要温和,温度要控制好,变性了就挂不上,此外在平衡缓冲液和样品中加 1-2mM DTT,这样也许会好点,洗脱的缓冲液一定要留意加 GSH 后调 pH 和平衡缓冲液一致

缓冲液中加 GSH 后 PH 值变化很大吗?这对融合蛋白的洗脱很关键吗?我的试验难道是结合在柱子上的融合蛋白没有洗下来?请 chromatography 兄赐教!

很重要,GSH 酸性, 加后如果 pH 低洗不下目标蛋白, 还需要注意样品处理, 最好破碎后就纯化

chromatography 你好, 你说 GST 柱子使用时洗脱液和平衡柱子的 Binding buffer 的 pH 值一致, 但是柱子说明书上的纯化步骤中提到的洗脱液的 pH 8.0, 而 binding buffer 的 pH 为 7.4, 洗脱液和平衡柱子 Binding buffer 的 pH 值之间有些差异对洗脱影响很大吗, 请问这是什么原因? (我使用的柱子是 GE 的 GSTrap 4B 1 ml 柱), 谢谢。另外还有一个问题, 就一般的量而言, 洗脱时大概需要多长时间, 我用的是 AKTA 纯化系统, 发现洗脱时 UV 值都是负值, 请问这正常吗, 通常而言 UV 值需要多大?

这个没确定的,负值也许是你的平衡缓冲液和洗脱不一致造成的,洗脱通常 3-5 个柱体积足够了

chromatography 你好, 我的问题解决了, 确实是洗脱缓冲液的 PH 值没有调整导致融合蛋白洗脱不下来。你们公司的 GST 亲和柱一般在使用多长时间或者多少次后需要用 0.5M 的 NaOH 再生 (有很多人使用 0.04M 的 NaOH, 0.5M 的 NaOH 高浓度碱对层析介质有影响吗?)? 需要每次使用完后用 NaOH 处理吗? 根据你的经验柱上切割蛋白与洗脱下来再进行切割, 那种方法更有效, 感觉柱上切割比较简单! 谢谢

解决就好, 再生没确切的次数, 如果载量下降明显那需要再生, 通常不同厂家的介质耐受 NaOH 不一样, 最好参考说明书或者问厂家, 我觉得每次用完都清洗干净是不错的选择, 否则时间长寿命有影响。柱上切应该更好点

再请教一下: 我的蛋白在过 Sephadex-G50 时, 可分出三个蛋白峰, 但是三个峰是连着的, 很是苦恼, 因为我要求蛋白的纯度较高。柱规格为 1.6\*50cm, 流速为 0.3ml/min, 用过 0.1M 醋酸氨缓冲液, 0.15M 氯化钠, 分离的曲线几乎相同, 三个连着的峰; 也用过双蒸水冲洗, 只能分出两个峰。

加长柱子到 100cm,流速再慢点试试,如果还这样,可以减少上样体积

麻烦问一下, 我要是用两个公司的 HIS-TAG 填料, 能不能用相同的缓冲液来过柱?

可以

chromatography: 已经看到贵公司有预装柱了, 我的样品比较粘, 还有色素比较重, 这样的话是先过离子交换好一些还是先过凝集素亲和柱好一些呢? 感觉先过离子交换能够去除一些色素以及核酸多糖类物质, 但是特异性不好; 亲和的话特异性好但是多糖类的粘性物质应该有影响吧?

你可以先上离子柱,再过亲和,你需要知道你蛋白的糖是什么类型的,才好选择凝集素亲和填料

求助, 我是新手最近才做纯化, 现在要装一个 sephadex-200 的柱子, 柱子规格是 1.6\*100cm, 我想请教几个问题, 我应该用多少填料, 填料装柱前应该怎么处理, 装柱的具体操作应该怎

样，请学长指点迷津

可以参考<生物化学实验方法和技术>中的有关章节,按你的柱子,至少需要 20 克填料或 20 毫升的填料,新填料直接用水溶胀装柱平衡后就可用,具体的操作很难在这里写清楚,所以自己去看看相关实验书吧如果有具体问题再来讨论.这个填料太软,流速很慢,不好操作,有条件最好选择预溶胀好刚性好的填料

用离子交换分离蛋白的时候可以加巯基乙醇吗?浓度可以多大?我表达一个融合蛋白,用羧胺切后(酶切效率达到 70%)想利用离子交换进行分离纯化,结果我的目的蛋白总是和融合蛋白在一起分离,伴侣蛋白可以分开,楼主遇见类似情况吗?不知道目的蛋白和融合蛋白间通过什么相互作用,我的目的蛋白等电点在 9.3 左右.伴侣蛋白的等电点是 5.6。

可以,我不很清楚,同时 1-2mM 即可,具体的实验我没遇到过,自己多看文献多试试吧

楼主你好,最近我用了 GE 的 Histrap hp 5ml 的预装柱,用了两次以后柱子上面一圈都变黄了,用 1.5M NaCl 和 1M NaOH 洗过以后还是没有洗掉.请问是什么原因会造成它发黄,有没有什么办法能洗掉。

不是色素就可能是镍离子被还原,只能洗掉镍离子重新螯合

请问柱子上切的具体方案和步骤?我在园子里看到做肠激酶酶切的,说需要摸索酶切条件,所以建议先过柱再酶切.还有酶切缓冲液中还有钙离子,这样对 Ni 柱是不是会有影响呀。

钙离子不应当影响镍柱的,你试试不就知道了

我用 EMSA 想分离 DNA 结合蛋白,请问为什么在胶上跑不出条带,在膜上可以呢?现在怎么才能回收呢?

这个我不很清楚,发外面问问吧

再问个问题,我们现在用的离子交换树脂 D311 用正洗的方法(碱酸碱)来洗的话,效果不好,有时根本挂不上;换成反洗(酸碱酸)效果还可以的,能够分离开.但是,要把酸浸泡过的洗到  $\text{pH}=6\sim 7$  感觉好慢啊,我都洗了一天了,(我是直接用大桶来洗的,不是在柱子上进行的)现在的  $\text{pH}$  还在 4 左右,有没有什么办法能够快一点啊?要是不到中性直接拿缓冲液( $\text{pH}=7.3$ )浸泡的话,会对走样时的分离结果有很大影响吗?上一次使用时,柱子上端 PBS 的  $\text{pH}$  在 7 左右,流出来的  $\text{pH}$  在 3 左右,平衡了好长时间都没有平衡好,狂晕啊

抱歉,我们做生物大分子分离纯化很少用树脂,不过通常加盐或提高浓度可加快平衡。

chromatography 老师,我有个问题想向您请教,我们以前用的伯乐公司的羟基磷灰石干在柱子里了,我用缓冲液重悬倒出来溶胀后还可以装柱使用吗?他们说羟基磷灰石刚性很差,这样羟基磷灰石容易碎,吸附能力减低,并能流出柱子下边的筛网,这样就恐怖了,希望您赐教!

应该可以，你取出加溶液过夜再装柱子试试，其实那填料是不收缩的，刚性不会太差的

你好，我是从动物皮肤中分离抗菌肽，分离了有一段时间了，分离纯化效果不好，活性也不是太好。我的抗菌肽群（约有十多种小肽）经 cDNA 分析在 2 K 左右，等电点 P I 在 5 - 12 之间均有，应属阳离子多肽，且用的亲水 有的疏水。我按大部分文献方法提取皮肤活性肽：百分之八十的甲醇提后过凝胶柱 G - 25 (10 \* 500)，有 5 个峰，2. 3. 4. 5 峰不完全分开，但可以检测到 2 为活性峰，可我在冻干时却只能干成油脂状，或看似冻干了，一接触空气就变粘状了，分析是由于脂类物质的影响，我试过有高速离心除脂，但还是冻不干。如果用盐溶液提的话，除盐很难，G - 15 基本无作用，我下一步要做电泳和质谱及双向电泳，怕盐有影响。求您解惑：1. 如果用甲醇法提的话，过完柱用丙酮沉淀对活性是否影响很大，是否可以一试？或是用什么方法除脂。2. 我所提的抗菌肽文献描述为阳离子肽，但 cDNA 分析有少数 P I 为 5 左右，我可否用离子柱纯化。3. 我的蛋白很多都是未知的，应该是无法用亲和层析分离，我该用什么方法纯化我的蛋白，请您为我分析指导一下。

你可以先用丙酮或者石油醚或甲苯先脱脂，干燥后再提取，这样应该会好点，2 可以用离子柱先粗分再上凝胶柱子，此外可以选择 HPLC 制备，除盐可以选择孔径更小的，我记得曾经有客户去 1000 多的肽，效果还不错，你可以试试 G10 类的填料

Chromatography 老师：我用 Histrap HP 柱来纯化一个 HIS 标签的蛋白，收集出峰的管，电泳时发现出峰的管根本不是我的目的蛋白，而是杂蛋白，而后面收集的没有出峰的管（紫外吸收在基线以上）有几管杂蛋白与目的蛋白同时出现，没有杂蛋白出现的管目的蛋白浓度也很低了，怎么回事啊？这根柱子我用了 4 次了，前几次没有出现这种情况，4 次都是纯化同一个蛋白。是不是我的柱子需要再生了阿？我看说明书说 load 0.5ml 0.1M NISO4 on histrap,load 这个词我不太明白，就是怎么去操作？

[www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中有常用填料的再生方法,包括类似镍琼脂糖凝胶说明书.你可以参考,我觉得你需要彻底清洗后重新螯合镍离子.不是简单的直接用 0.5ml 0.1M NISO4 on histrap 即可

请问老师怎么彻底清洗呢？用 NAOH 吗？我使用的是 AKTA 纯化系统

仔细看看填料和柱子的说明书,里面都有,我给你说的联接也有

这段时间用镍柱纯化和复性蛋白，用的 pH 梯度洗脱。配方如下： Buffer A 20mM Tris-HCl, pH 7.4, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 0.1% TritonX-100。 Buffer B 20mM Tris-HCl, pH 7.4, 150mM NaCl。 Buffer C 10mM Tris-HCl, pH 8.0, 100mM Na2HPO4, 6MGdnHCl, 0.5% Triton X-100, 10mM b-mercaptoethanol。 Buffer D 10mM Tris-HCl, pH 8.0 and 100mM Na2HPO4 Buffer E 20mM NaOAc, pH 4.0 and 150mM NaCl。菌体在 Buffer A 中 超声，包涵体分别用含 0.5% Triton X-100, 2M NaCl, 2M urea 的 buffer B 超声洗涤，在 Buffer C 溶解了包涵体过夜。上样后用 10 倍柱体积 Buffer C 洗柱，分别用含 5, 4, 3, 2, 1, 0MGdnHCl 梯度 Buffer 洗柱，最后用 Buffer E 洗脱，结果收不到蛋白，而将洗脱液调到 PH=2 左右时有蛋白被洗下来，可是这时候蛋白已经变性不能用了怎么办呢？哪里出错了么？请教一下

你可以用缓冲液加咪唑洗脱试试

再麻烦楼主看一下我的分离现象：我的融合蛋白酶切后在里面加入了 8mol 尿素和千分之三的巯基乙醇作用 2 小时后走分子筛。用 S100 柱，柱长 1.2 米。我分离的蛋白大分子量为 40KD，小分子量为 14KD。其他杂蛋白很少，走柱子发现在约 35ml 处检测到一蛋白峰，电泳检测为目的蛋白 14KD。这里出峰应该是排阻才对呀？为何 14KD 很早就出？后来我在样品里加入 1.5% 的 SDS，发现分离行为同前面一样。而常规 SDS 电泳检测这两个蛋白是分开的啊？

变性条件下蛋白是链状的,并不是球型的,所以色谱行为和天然的有很大差别.我觉得你可以用离子交换等别的方法试试

我是新手有个问题 我要纯化的是 90KD 的 包涵体形式的蛋白 用了亲和层析可是不好 应该怎么办 我想用离子交换行吗。

是带标签的吗,如果是最好再试试亲和,请说详细点。

是带标签的 GST 是不是蛋白分子量太大把标签包住了呢

最好是可溶性表达的,破碎和提取要温和,GST 部分没活性就挂不上,此外可以在样品和缓冲液中加 1-2mMDTT,这样也许好点,此外还要保证填料本身也没问题,多看看相关的实验材料,也可以搜索一下.别的方法更难,也不一定能做好

那如果用离子交换呢 等电点是 7.62 的 应该选什么样的柱子啊我想试一试

离子交换可不好说,需要试才知道.也许可以先选择阳柱,短粗柱即可

请教 chromatography 老兄一个问题：过 NI 柱纯化 his 标签蛋白的时候，洗脱的流速跟洗脱的效率有什么关系？一般用多快的流速洗？谢谢！

通常流速在一定范围内对洗脱影响不大,不同的柱子不大一样,我觉得 1-5 毫升/分钟,看柱子而定

请教 chromatography, GST 融合蛋白中 GST 的等电点是多少？我想用离子交换分离 thrombin 酶切后的目的蛋白，我的蛋白等电点为 5.2，但是我怎么也查不到 GST 的等电点。谢谢！

我也不知道它的等电点,也没用离子柱做过,你可以根据你目标蛋白来试试,选择阳柱看看

chromatography 兄：近来用 superdex200 的预装柱发现流速较慢，柱头也较黑，就用 0.5NaOH 冲洗了 2 个柱体积，但结果发现流速更慢，压力更高了（0.2ml/m 流速 1MPa 压力），用其他 buffer 冲洗（如 5M 盐酸胍和 0.2M 盐酸），也没有任何效果。昨天把预装柱拆卸重装了一次，在装填过程中，可以用到 0.8ml/m 流速，而压力也只有 1MPa。重装完成后，昨晚用 0.5ml/m 流速的 buffer 冲洗柱子，但今天早上发现，压力依然过高（0.2ml /m 流速 1MPa 压力）。我分析主要有几个原因： 1.填料介质没有处理好（应该怎么处理呢？） 2.是否是筛板堵塞了？ 3.是否填料本身玩完了？由于这样的一根预装柱价格需要大几千，所以想重复利用，请楼主

给分析一下

这样的柱子需要小心维护,样品和溶液要过滤,离心是不行的,我觉得你可以把填料取出,混悬,沉淀,去比填料沉淀慢的东西,反复几次,装柱后还可以用 70% 乙醇洗,可以加 1%吐温等,去除脂类物质,这样也许应该好点,因为太脏,而且也许压力过大的碎了.筛板可以超声清洗,这样用没问题了

请教 chromatography: 下面是我纯化电泳时的图片。Marker 分子量从上到下依次为 200, 116, 97.2, 66.4, 44.3, 29, 点样顺序从左到右为: marker, 对照, 诱导总蛋白, 超声破碎上清, GST 亲和层析, gst 融合蛋白酶切, 酶切后过 GST 亲和柱, 谷胱甘肽洗脱。我的蛋白 62KD, 融合蛋白约为 62+26=88KD 我的问题: 1. 目标 GST 融合蛋白表达量比较低, 而翻译提前终止的蛋白比较多 (我的分析不应该是蛋白降解), 所以纯化第一步是否应该先离子交换去掉其它的 GST 蛋白。2. 弱阴离子层析介质和弱阴离子介质相比是不是其电荷密度更高, 在蛋白纯化中吸附蛋白更牢固。3. 根据目前情况使用什么纯化策略最好。

1,不用,亲和就可以,2,吸附力不见得会更大,只是强的工作范围更广.3.我觉得还是要留意样品的处理,温和等,多摸索一下纯化的条件,不建议换柱子

chromatography 老师您好, 我用 his-trap 柱子纯化一个蛋白, 用第一次, 目的蛋白洗脱下来后, 柱子上段近 1/2 变成了黄色, 请问这是怎么回事啊? 可以清洗掉吗? (我的蛋白是可溶性的表达, 用上清上柱的, 0.1% NP-40)

也许是样品或者缓冲液中有还原剂,应该去掉或者降低浓度,如果不是这问题也许是有色素

请问 chromatography 老师, 如果是因为还原剂的原因, 该怎样对柱子进行处理呢?

可以用还原剂洗到黑,然后流出,柱子变白后彻底清洗再重新螯合金属离子

请教 chromatography: 我从组织样品中提取粗蛋白(不是表达蛋白)进行 GST 的亲和纯化,柱子是安法玛西亚的 GSTrap 4B 1ml 预装柱,样品制备中也加了 1mM 的 DTT,清洗时出来了不少杂蛋白,但是洗脱液 GSH 的浓度加大到 20mM 也没有洗脱蛋白出来; 我在想是不是蛋白没结合上去,于是对样品又进行了过柱前的 pH 调节,的确样品缓冲液与 Binding buffer pH 差异有些大,调到一致(pH7.4)后才过滤上柱; 1) 有一点需要说明的是因为手头的滤器只有 0.22 微米的,所以用这个过滤的,会不会把目的蛋白给滤掉? 2) 因为连接的是 AKTA 系统,分析软件显示除清洗杂蛋白时压力一直为 0 外,其他如洗脱过程中压力一直在 0-0.03MPa 范围波动(清洗,洗脱时流速均为 1ml/min),会不会是压力的问题? 3) 另外样品制备时因为涉及到手动研磨,两次离心以及过柱前的 pH 调试,或许对 GST 活性有影响,可否在样品中添加 PMSF,我打算纯化后做 N 端测序,中间有哪些还要注意的细节问题,另外上述过程中有哪些可能的问题?

1,过滤和纯化等步骤要留样对照,用活性或别的检测方法保证操作过程中没丢失.所以只能你自己去找问题的原因。2.压力有问题和洗脱没什么关系,我怀疑你目标蛋白的浓度太低,不够检测,所以电泳做不出或者洗脱没东西,此外洗脱缓冲液一定要调 pH 和平衡柱子的缓冲液一致。3.具体原因你需要用检测方法如活性方法等去检测,我没办法判断实验没结果的原因

首先感谢你的回复。此外,我也怀疑目标蛋白的浓度太低,不够检测,但是因为上柱前还要用酸度计调试样品 pH 和平衡 Buffer 一致,所以把样品稀释了不少,同时,倘若浓度高上样量大会造成流穿是一种什么现象?它是如何确定的?

只有电泳检测是不后的,此外用穿透和样品对照浓度没差别就说没吸附也不对,流穿有什么关系,多上样吸附才多,做的太少怎么检测,都不知道问题出在哪

chromatography 您好,我是一名预防兽医学的学生,在纯化 IgA 以后我使用的是 SDS-PAGE 来鉴定的,因为是个新手,在电泳的时候出现如下问题我不太清楚,请您帮助解答。电泳条件: 15%分离胶, 5%浓缩胶, 100V 浓缩胶, 120V 分离胶, 时间 4 个半小时。我使用的样品浓度是 2.1872mg/ml, 梯度加样量从 10 微生到 15 微生, MARKER 严格按照说明使用,但是每次总得不到理想的结果,特别是在样本进入分离胶的时候,上面总有一些物质滞留,请老师您帮助分析一下图片,看看是什么原因引起的,应如何调整改进,最近比较着急

抱歉,我做电泳也不多,你只能自己看看,或发到外面问问,我觉得你需要留意缓冲液等,同时也留意样品的制备,你的分离胶浓度是不是合适,此外跑电泳时间别太长,总之自己按实验书去做也许会好点

我是严格按照实验指导做的,胶的浓度是按照以前的一个博士做的论文“鸭的 IgA 鉴定方法进行的”,但是我电话咨询的时候,他说记不清了

我觉得你还是查查书,根据你的分子量选择合适的胶浓度,这样才好.此外可以看看有关电泳的书,这样会有好处的

我用 Q 柱(HP)前几日做了一批染有真菌的细胞液,上柱前用 0.2 微米的膜处理过,但是做完柱子后发现出来的蛋白比上样量少很多(15%左右),而且用 2M NaCl 处理也没有蛋白流出,后来又做了没有染菌的细胞液,也发生了类似的状况,这之前的收率一直在 80%左右,且胶的颜色发灰,用 NaOH 处理也没有好转,怀疑是胶变性了,请问是否有遇过此情况发生,应该怎么挽救呢?谢谢了

很难说明到底是出在哪里,你最好每一步骤都留样检测蛋白浓度,这样好知道丢失在哪里,此外留意检测方法,会不会洗脱别的溶液的干扰,自己查一下吧

请教下,我以前做过 HIS 融合蛋白,在纯化的时候用的是 NOVAGEN 的一个产品,具体是什么我查了也不知道是什么了。所以想问下,您那有那种不用装柱,在 EP 管直接进行吸附操作的吸附基质吗?看了公司的网页,因为基本都是文字,也看不出来什么。师兄师姐都不做蛋白的,都不清楚。

有粉末形的 Ni-resin HP 就可以不过柱子,直接用离心操作即可,你可以参考产品目录和说明书即可.是浅绿色的粉末

请教 chromatography 老师:我依据文献准备纯化一种血清蛋白 SAP, 聚合物 200KD, 单体 30KD, 由于其 Ca 依赖条件下直接与琼脂糖结合,所以用的琼脂糖 4B 直接做亲和层析,用 EDTA 洗脱。结合液是 0.14 M NaCl/0.01 M tris/0.002 M CaCl2/0.01% NaN3 at pH8.0

(Tris/saline/Ca)。洗脱液是 0.14 M NaCl/0.01 M Tris/0.01 M EDTA/0.01% NaN<sub>3</sub> at pH 8.0 (Tris/saline/EDTA)。我用结合液平衡的 4B 珠子与血清混合 (2: 1), 4 度搅拌过夜。上柱, 结合液洗到 OD<sub>280</sub> 降到 0 为止 (其中有高达数千的洗脱峰)。换用洗脱液, 结果没有显著的洗脱峰, OD<sub>280</sub> 逐步缓慢增高, 1h 后稳定在 100 左右, 持续 3h 才降低, 最后到了 30 左右。我把 OD 值 100 左右的液体全部收集超滤 (30KD), 最后在 100KD 左右有明显条带, WB 尚未做。不知道为什么不出峰, 是蛋白量少? 还是柱体积大?

也许含量过少, 你应该有活性或者别的检测方法才知道有没有你要的东西, 此外如果真样品中含量少就得加大样品的量, 所以最好选择过柱这样的方法更好。所以最重要的是纯化前要有检测目标蛋白的方法

chromatography: 你好.像你请教一个问题.我做的是胞外酶,浓度很低.试过了硫酸铵沉淀,乙醇沉淀最高浓度都不能将它沉淀下来.因为我的底物和产物都是酯类,不能通过离心什么出去,胞外酶总浓度很低,所以又试了直接过大孔树脂想除去酯类,结果效果也不理想.过了大孔树脂超滤后的溶液,我过了 DEAE Tris-HCl pH8.0 的柱子.结果,穿出有酶活,0.05,0.08,0.12,1M NaCl 洗脱,各个部分都有,根本没有效果。而这个酶的性质,都还没研究过.根据文献写别的菌里的这种酶,第一步都是硫酸铵沉淀.所以都不知道怎么办了

浓度太低是不适合用沉淀的方法沉淀目标蛋白的,当然去杂也许可以这样做,此外我觉得你还是需要用离子柱的方法去浓缩富集你的目标蛋白,否则没办法进一步去纯化,可以多看看相关的实验书,如果你知道底物或者抑制剂,也可以考虑能不能用亲和的方法去纯化,总之想一步得到好的效果是不大容易的

我是新手,刚接触蛋白纯化及测序这块。我分得一小于 1000 分子量的肽,想要测序,但用 Q-TOF-MS 打出碎片离子,和空白溶剂峰的碎片差不多,没有样品的离子碎片,太奇怪了?这是困惑一!只能试试氨基酸测序仪,但由于我的肽不是很纯,要用 PVDF 膜纯化,那请教 chromatography 大哥,我需要必备什么仪器什么材料,可以自己完成 PVDF 膜纯化?这是困惑二!需要凝胶电泳吗?还是有膜有染色剂就行呢?如果染色出现几条色带,那我如何判断哪条色带是我的目标肽呢?通过分子量吗?为什么?

这个 Q-TOF-MS 我不是很熟悉,你最好问做这方面的人,看到底可能是什么原因才好解决,此外就这样的小分子而言,直接用 HPLC 制备就可以得到你需要的纯品,此外可以配合液质联用去解决,你多问问做这方面的人吧

曾得到过您很多的帮助,在这里表示由衷的感谢!现在又有一事想请教您,我用原核表达蛋白制备了一个血清蛋白的多克隆抗血清,现在想要检测一下这个多克隆抗血清与天然血清蛋白的反应特异性,但由于该蛋白在血清中的浓度很低,我可以用免疫沉淀的方法检测多克隆抗血清的特异性吗?我是这么设计的:首先,将多克隆抗血清加入待测血清中,使抗原抗体相互结合;然后,再加入蛋白 A 凝胶珠,使之与抗原抗体复合物结合;最后,将蛋白 A 结合的蛋白复合物用同一个多克隆抗血清做 Western blot 检测。您看,这样设计可以证明抗血清与血清天然蛋白的反应特异性吗?如果可以,在实验中应该注意些什么?

别客气,这样的实验没做过,我觉得要是单抗也许好点,而多抗很复杂,难免会有干扰,也不一定好排除,你发外面问问大家吧

chromatography 老师你好,请教个单抗纯化的问题:单抗纯化过程:pH7.4的PBS平衡ProteinA柱, pH2.4的 Gly- Cl 或柠檬酸 buffer 洗脱, 收集管中预加中和用的 Tris-Cl, 洗脱过程中即出现较多沉淀(溶液带浅黄色)。对 PBS pH7.4 进行透析, 出现较多浅黄色沉淀, 原浅黄色溶液变得无色澄清。离心后检测上清液, 抗体含量约有 1mg/ml。不知道这个沉淀是不是我的目标蛋白(已经在用电泳检测), 也怀疑过 pH2.4 可能太酸, 但是 pH3.5 的 Gly-Cl 根本解离不下来。请教下, 如果这些沉淀是我要的单抗, 我该如何防止解离过程中出现沉淀? 如果不是我要的单抗, 那会是什么东西? 像这样, 规模放大之后柱子是不是很容易堵, 可不可以借助上柱前的超滤之类的步骤防止类似现象发生?

取点沉淀加电泳上样缓冲液处理跑电泳看看,或者用检测抗体的方法不就知道了,我个人猜测应该是抗体,也许你洗脱 pH 可以改到 3 试试,此外洗脱后应该马上中和到中性也许会好点,此外可以在洗脱液中加甘油或者 PEG 保护看能不能好点了,我觉得是抗体的可能性大

我的蛋白表达量很低, 42KD, 几天辛苦下来才有浓缩了几管, 今天拿出来解冻后, 发现蛋白很多沉淀了, 白色絮状, 离心后跑胶已经所剩无几了。。。我的洗脱液成分: 500MM NaCl 50MM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 270MM 咪唑, 10%甘油, 5MM 巯基乙醇。目的蛋白等电点预测值是 9.11, 我洗脱液 PH 值是 6.8 我用的是浓缩管浓缩, 浓缩时温度是四度。蛋白解冻是先放在-20 度, 后转移到冰上解冻的。请问沉淀是什么原因呢? 另外我听过一些蛋白即使不沉淀也不见得活性, 这种情况多见么? 和蛋白本身性质有关呢? 还是和纯化过程有关? 是否可以避免?

有时候蛋白冷冻会导致沉淀具体的原因也许和蛋白有关,此外也和浓度有关,我觉得还是因为蛋白本身的问题,冷冻的时候如果能加 30-50%甘油也许就没问题,还有有时候咪唑也有影响,所以需要去除后再冷冻保存的好

chromatography: 你好! 最近试用 CNBr-Sepharose4B 的凝胶柱挂 HRP 不能成功, 不知道能不能用于挂内毒素? 另外看见你有亲和方法除内毒素工艺, 不知能不能讨教。

如果只是固定化 HRP 那用 CNBr-Sepharose4B 应该没问题,只是需要留意样品中没别的带氨基的物质,如 Tris 等,不明白你说挂内毒素是什么意思,我们是用去除内毒素的,所以你说清楚点,需要材料可自己去 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中去下载

我在纯化一种酶, 要用到 CM-SephadexA-50 填料。想请教一下高手, 用过的胶该怎么处理呢? 我先用 0.5M 的 HCl 浸泡, 用蒸馏水反复冲洗, 到中性, 再用 0.5M 的 NaOH 浸泡, 这时明显看到胶体膨胀, 比原来增大了好多, 接着又用蒸馏水冲洗到中性, 再加 0.5M 的 HCl 浸泡, 胶看上去就少了很多, 然后用蒸馏水冲洗, 最后用缓冲液平衡, 装柱。这样处理对吗, 如果把用酸碱处理的顺序弄反了是不是就洗不下来了啊

可以不处理,直接用缓冲液泡过夜没气泡装柱子即可,此外这填料太老,最好选择 CM-琼脂糖凝胶类填料代替,因为它在盐和压力等条件下体积会有很大的变化,因此现在不常用

最后我找到了, SDS 的电泳结果为什么会是那样?

是因为: 二倍样品稀释液没有配好的原因。

谢 chromatography 老师的指点。还有一个问题想请教，就是离子浓度的选择，我看资料上有用 0.01M 的，也有人用 0.05M 的，是根据什么来选择的呢。我已经在做第三步纯化了，是不是用 0.01M 就可以了啊？

我觉得浓度高低是由自己的蛋白决定的,所以只要能挂住又有足够的缓冲能力就可以了

谢谢老师指导! 我的目的蛋白因为产量少, 实验室条件有限, 两天做一批的话大概要一周时间产能拿到足够的蛋白(我要打单抗), 我本来的计划是把一周的蛋白二次浓缩后上分子筛, 但是样品中的甘油成分就要严格限制了吧? 如您所说的加 30%~50% 的甘油保存, 那我上分子筛的话就很困难了。请问蛋白质是否有短期保存并且不影响分子筛的办法呢? 另一个问题, 做的另外一个蛋白, 表达量很好, 预测等电点 6.75, 开始试剂 PH 值是 8.75, 但是洗脱下来后浓缩前离心就发生了沉淀。后来 PH 调整到 9.5, 浓缩前沉淀减少, 但是蛋白很多都沉淀在镍柱上了, 只能洗脱下很少量的。沉在柱子上的蛋白甚至 0.1M 的 EDTA 也洗不下来。不知道是不是 PH 值的原因呢? 以您的经验, 什么样的蛋白容易发生沉淀呢?

甘油应该影响不大,当然得看你用的填料,如果手工操作黏度大可能流不动.第二个问题也许是蛋白容易聚集沉淀,所以可以加点吐温等表面活性剂试试,如果是疏水性强的蛋白,这样应该是有用的,膜蛋白很容易沉淀,疏水性强的蛋白也是如此.在镍柱子上的蛋白最好用变性剂加咪唑去洗脱.否则别的东西很难洗掉沉淀的

谢谢 chromatography 大哥指教, 制备液相以前也试过, 接出来的每个峰纯度不高。液质联用我在军科院那试过, 没打出碎片, 解不出序列, 很奇怪。我现在正在尝试用电泳的方法测纯度。

纯度不高可以优化条件,其实不是一过 HPLC 就能纯的,也可以配合常规离子柱子后再上这样也许效果更好.或者收集后再上一次

小弟最近在纯化个蛋白, 蛋白上没有任何标签,实验要求就是要没标签的蛋白,蛋白 PI=4.2, 是带负电荷,小弟已经试过好几个柱子了,离子交换, 疏水层析, 凝胶过滤等;效果都不好,还是不纯,小弟请教 chromatography 有没有非常有效的方法来纯化没标签的蛋白呢?

其实纯化常规就这些方法,关键是你需要去看看书系统学习一下,这样才能更好优化你纯化的条件,这也是纯化相对更需要经验的原因,而且不同的人做不一样,我觉得如离子交换,疏水等,最好选择细致的阶段洗脱也许效果比粗放的线性洗脱好,所以你只能自己多去摸索洗脱的条件,配合电泳,这样才能做好,没什么捷径

chromatography 老师, 我想请教一个关于蛋白质纯化的问题。基因重组蛋白, C 端 his-tag, 用大肠杆菌表达, 全都是包含体。用 6M 的 Gdn-HCl 溶解后, 直接上 Ni-NTA 纯化, 用的是 100mM imidazole 洗脱的。之后低浓度下, 通过阶梯式的透析慢慢的给蛋白质复性。然后离心, 去沉淀, 浓缩之后用 HPLC 进行 Gel filtration 来看组成, 主要是看 dimer 和 monomer 的含量, 然后再用更大的 column 进行分离。以前顺利的能用 HPLC 分析出 dimer, monomer 的时候。最近一直不顺利。然后发现, 10mM 的 imidazole 的时候溶解的包含体能检验出来蛋白质, 可是 100mM 的 elution 的蛋白质就检验不出来。imidazole 本身对蛋白质的 aggregation

有什么大的影响吗？另外，压力也有增加，是不是蛋白质沉淀在柱子里面了？我倒过来洗了之后也不见缓解。和我用的 buffer 有关系吗？

主要还是变性后复性的蛋白不稳定,所以我想和你还是找找这方面的原因,而且样品最好浓度别太高,这样也许好点

chromatography 老师,感谢你先前的指点。因为老板不同意换其它填料,我还是只有暂时用 CM-SephadexA-50 做离子交换。用的 0.01M pH5.8 的醋酸钠缓冲液, 0-1M 的氯化钠线性洗脱, 有文献报道按此方法从另外的蛇种里纯化到了和我相同的酶。我晚上临走设定洗脱两个多柱床体积, 按往常差不多应该都洗下来了, 便没有管柱子会不会干。结果第二天一早来发现高盐的一边没有出水, 相当于淋洗了一晚上。不幸的是柱子干了, 我又重新加上缓冲液洗脱。测吸光度的时候, 发现浓度达到 1M 的时候蛋白含量还很高, 然后又用 1.5M 的盐洗了 1 个体积, 还有较高的蛋白含量, 然后又换用 2M 的盐.....出现这么反常的现象, 是不是因为我的柱子干了的原因呢。正确的处理方法应该怎么做呢？

也许有蛋白沉淀,只用盐难洗干净,最好再生,这填料也不能在柱子上再生,没办法,你还得重装柱

请问 chromatography 老师: 1,TFA 变棕红色了还可以用吗? 2,我经过分子筛和离子交换得到一样品,做了反向 HPLC 后还想收集样品,应该怎样去除 TFA 以及让该蛋白质恢复活性呢?是否可以用透析脱盐的方法?

这个我真不清楚,应该有颜色不能用了.变性的蛋白不一定都能恢复活性,我没听说 HPLC 后的样品复性的。没那么简单只去 TFA 就可以的

我想问一下,我分离纯化后的样品,进行了反相 HPLC,但是分离后的图很差,很快出现一个大的爬坡峰,后面的蛋白峰还算标准的样品峰,所以在考虑前面的成分是什么?请指点!

这是没办法猜测的,你只能自己收集检测,或者想别的办法鉴定,也许是溶剂或者样品中别的杂质都不好说

chromatography 兄,请教几个问题:我现在在做多糖的纯化(M:300000-800000),用的 sephadexG200,不知道是用 NaCl 溶液洗脱还是用超纯水洗脱好?另外就是我的柱子老装不好,还有上样也出问题,样品下降不均,这是我用分部收集器每 2ml 一管,测 490nm 吸光值(纵)管数(横)作的图:

抱歉,我做糖很少,但是我觉得你应该选择 sephadexG75,会更好点,因为 ephadexG200 分离范围太宽了,效果不会好的,而且多糖是链状结构,和蛋白不同,理论上应该选择比蛋白更窄分离范围的效果更好,凝胶柱子分离效果一般,如果带电荷的话还是配合离子柱会好点,所以效果不好也不一定是装柱子的问题,上样最好先封闭柱子下口,然后上样完再打开,这样可以比较均匀

谢谢 chromatography 兄,国庆快乐,文献上大多说用 G200,所以就用了,只是这次重新装柱后感觉流速慢了一倍,连续装了两次都是,和上次不同的是我这次用的超纯水洗脱的(正

在洗脱中)。不知道是什么原因,是不是我的柱子需要再生后才能用第二次啊

也许是填料碎了或者上面有糖,黏度大,流不动,所以最好再生,如果还这样,那没办法,糖是比较难做的

您好!请教一下,我的蛋白峰分离的拖尾很严重,上升的速度还蛮快,就是洗下来的速度慢,搞成一个很大的拖尾峰。应该怎么样克服一下?谢谢!

不同的柱子,不同的条件原因不同,所以请说清楚什么柱子,什么洗脱条件

我的 tosoh 的 TSKgelSW3000 column 现在压力越来越高,用非常小的流速都不断的上升,以前压力很稳定的,就像上次我问的时候说过,可能是用的次数多了,蛋白质附着的多了,所以压力增加,倒过来冲洗之后也没什么效果,而且现在是每想清洗一次,压力就增加得更多,几乎已经都超过了最大的压力。我该怎么清洗呢?用含有尿素等变性剂?或者用 SDS?

你最好是看看说明书上怎么写的,用盐酸胍和尿素应该是没问题的,其实说明书应该有详细的清洗步骤或者直接问厂家也许更可靠

谢谢色谱老师。我昨天已经给厂家打电话,然后也 mail 咨询了。告诉我先用有机溶剂试一试,实在不行在用变性剂。另外我怀疑可能是 ending fit 那里有沉淀导致的压力的升高,因为,以前刚开始压力升高的时候, peak 还是正常的形状的

此外你可以把柱子取出,直接连管道,看看是不是管道堵了,如果没问题,那就仔细处理你的柱子

chromatography 老师:我纯化出了一真核表达的带人 Ig Fc 段的重组蛋白,放在-50 度的冰箱了,结果国庆节期间冰箱突然坏了,温度上升到 20 度左右,过了一天多才发现,不知对纯化后的蛋白活性造成多少影响,十分焦虑。非常感谢。

如果样品没沉淀我想你不需要太紧张,可以先试试看重重组蛋白 A 的柱子能不能吸附你的目标蛋白,如果没问题那就没事

chromatography 老师:我现在在做一种结构性蛋白降解产物得分离,分子量在 1000 左右,不知道应该采用哪种色谱柱比较好,想请教一下

HPLC 应该很合适.别的都没更好的效果

谢谢 chromatography 老师。因为我那个降解产物所需量比较大,所以我想用 FPLC 来进行纯化,采用凝胶过滤色谱,葡聚糖的填料,不知这样的设计是否合理,请指正

如果这样,最好先用离子柱,然后再过凝胶柱子,但是我觉得如果是小片段,还是 HPLC 制备更简单,而你只是用凝胶柱怕是浪费时间,要不就选择颗粒细刚性更好的凝胶填料才有点用处

chromatography: 你好!我们纯化一个微生物分泌的酶,弄了快一年了,一直效果不好。结

果条件摸索，目前的流程如下：培养液用硫酸铵分级沉淀后，透析浓缩后过 G-100，得到 2 个分得很好的峰，收集有活性的峰 1，浓缩后过 Macro-prep High Q 强阴离子交换柱（伯乐公司的层析仪，柱内径 1cm，柱长不到 20cm），过了很多次，效果不好，也不稳定。请你给点意见和建议。这张图是，平衡后，上样 1.5ml，洗脱条件 1—30min，20mM/ pH7/ Tris-HCl 缓冲液；30—90min，NaCl 浓度从 0—0.5M 梯度洗脱，90min 后恢复到 Tris-HCl 洗脱直结束。流速 1ml/min，但实际流速要小点，约 0.8ml/min。

少上点样，如只上 0.5 毫升，延长剃度到 3 个小时，同时流速加快到 2 毫升/分，这样如果还没效果，建议还是选择阶段洗脱的好，此外硫酸铵沉淀后可以直接上疏水，这样配合也许会有更好效果，实验不会只拉个梯度就能跑好的，所以我觉得你最好选择阶段洗脱，配合电泳找到合适的浓度洗杂带和洗目标蛋白

chromatography 老师：我请教一下关于聚丙烯酸、聚氨基酸、葡聚糖、肝素用于酶的修饰时如何活化，具体的方法是什么？？？谢谢。请教用于蛋白质层析时的缓冲液如何选择？具体的 pH 如何定

活化修饰你可以看专门的文献，这事情没具体的蛋白很难泛泛而谈，因为要根据蛋白本身的特性来做，有专门的酶工程这样的书有专门的章节，然后去查文献即可，至于纯化的缓冲液如何选择也是一样，不同的柱子，不同的蛋白要求不同，几句话是难说清楚的，所以只能有特定的蛋白特定的柱子才能说清楚，所以还是需要读一些基本的分离纯化的书更系统，在帖子里多处提到那些参考书，你可以去看看，最简单的是按文献做即可。其实原则只要能保证蛋白活性有不影响柱子的行为即可

我现在在做抗血栓方面的试验，需要用到 FITC 标记的纤维蛋白，纤维蛋白标记好后需要用 Sephadex G50 进行洗脱，以前没做过相关的实验，对洗脱条件把握不准，希望高手指点！！

这是很常规的实验，你可以去读生化实验书中的凝胶柱子的操作即可，可以参考<生化实验方法和技术>。其实很简单，和除盐差不多，用一般的缓冲液或者生理盐水就可以，但是需要能溶解 FITC。柱子不需要很高，短粗柱子即可，和除盐柱子要求差不多

请问装填 sepharose 4FF 16/100 的柱子装填流速应该是多少，平衡流速又是多少，有人说只要不高于最大线流速 250cm/h 都可以，这样算来就是 8ml/min，但我们实验室都是用 3ml/min 装填，1.5ml/min 平衡，1ml/min 上样和分离，是不是太低了

其实没特别的要求，因为关键看你的柱子好坏而定，如果好的柱子可以流速快点，压紧点，不好的柱子那就按你说的即可。如进口的柱子或者带夹套的好柱子，那可以用 6-8ml/min，但是不能超过柱子能耐受压力，如果最常规的单层国产的柱子建议别加大流速，压太紧，你可以试试提高流速，如果受不了，那就算了

我也向您请教几个问题，我现在用 DEAE 离子交换柱纯化蛋白，其实是重复前辈的实验，但是并不能得到满意的结果。其中有一些小问题在困扰我，1：填料平衡好后，过柱过程中会压缩很厉害，几乎快到一半了，是不是填料（是师姐已经用过很久的，我用碱酸处理了很多遍才用的）已经不好了？这样是不是很影响蛋白的洗脱呢？一般柱子能用多长时间啊？2：对于 20cm 的这种柱子上样量一般多大（我是按蛋白含量来计算的，体积关系大不？）

比较好啊？据说稀释很厉害的。3：我的缓冲液是磷酸柠檬酸缓冲液，时间长后会出现浑浊，对于洗脱是不是也有影响呢？

1.你的填料太老,应该是 sephadex 系列的,有条件建议选择 DEAE 琼脂糖凝胶类的填料,如果不换,那只能流速慢点,慢慢做,没办法,这填料有盐体积就所小,流速慢,用多久看维护,如果挂不上,而且脏,那就不能用了.2.一般可以按 10-20mg/ml 填料量来计算你上的样品,离子柱子和体积关系不大,也不会稀释样品,还可以浓缩.3 缓冲液 浑浊最好别用,会堵柱等,可以选择别的缓冲体系

我主要纯化抗体，从小鼠腹水、杂交瘤上清、动物血清中纯化，计划用蛋白 A、蛋白 G 的柱子，不知效果如何，楼主有什么更好的方法吗？有什么建议吗？

通常最常用的可以先选择蛋白 A 的柱子,如果很多样品,也可以配蛋白 G 的柱子,如果是多抗,建议偶联抗原去做免疫亲和纯化,建议看看抗体纯化的材料,我觉得 需要多种方法,很难一刀切,www.wsac.cn 资料下载中有一些关于抗体纯化的材料,也可以看看填料的选择指南,会有帮助的

我需要生物素标记的白蛋白，于是将过量生物素与白蛋白混合，最后要除去过量的未结合生物素，用透析的方法的话透析袋的截留分子量选择多大为好呢？

通常的透析袋都可以,5000 以上的就没问题

我想试着从培养细胞中小量纯化异源表达的 His 融合蛋白做一些下游的功能性实验，我直接将培养细胞裂解后，用 His 亲和柱纯化，得率还可以，但是纯度欠佳，所以考虑两种办法，一种是优化亲和层析的条件，但几次尝试的除杂效果都很一般。另一种办法是打算在过亲和柱之前用其他层析柱粗分离一下，但我是分子生物学出身，所以这方面不太擅长，想请教楼主的意见。我的目的蛋白质 50kD 左右，等电点大约是 4.7，疏水性偏强。请问有什么简单易行的层析方法适用于小量纯化，相关的填料可以选择什么呢？

我不觉得换别的柱子是好主意,建议你首先要注意样品提取的条件,如破碎等需要温和,样品马上要纯化,总之样品本身也很重要,如果不是样品问题可选择不同浓度的咪唑做阶段洗脱,讨论过很多,www.wsac.cn 资料下载中有镍琼脂糖凝胶说明书可做参考,此外也可以参考别的公司的说明书,纯化有时候不是一做就能做好的

请问楼主有没有自己制备过亲和层析柱,我用活化好的 SEPHROSE 4B 和肝素偶联，最后好像柱子的颗粒变松了,是什么原因

做过很多亲和填料,我不知道你用什么方法活化的,也许你改变了填料的结构,刚性差了,肝素偶联是比较特殊的,常规方法做的效果并不好,所以你需要不多我觉得你还是买现成的好

不好意思，你回复的话中“2.一般可以按 10-20mg/ml 填料量来计算你上的样品”，我不大能理解，能否麻烦您给详细解释一下呢？

一般可以按 10-20mg/ml 填料量来计算你上的样品,也就是说 1 毫升的填料可以上 10-20mg 蛋

白这样计算你上的样品,不超过这个就可以

我想问一下,您用过 QIAGEN 公司的 Ni-NTA Spin Kit 试剂盒吗?订了个试剂盒,说明书上说的步骤不是很详细,或许我没大弄明白,有点迷糊,不知道怎么操作了。

其实操作和过柱是一样的,只是用离心的方法做而已,自己多看看说明书,或者问他们公司的人,可以参考别的公司的说明书

我是第一次做蛋白质纯化,想请教些问题。DEAE-sephadex A50 在层析结束后用 1M NaA(pH3.0)和 0.5M NaOH 交替进行清洗就可以再生好吗?并且请教问什么用完 0.5M NaOH 后凝胶会大量的挂在玻璃壁上,那些挂壁的凝胶还能用吗?我看到您提到 DEAE-sephadex 上样量,我要是想用此凝胶作批量吸附体积在 300ml 左右,那上样量就需要 3-6 吗?我所要纯化原始蛋白是在血清中粗提出来的。

挂壁也能用,这个填料太老了,建议换 DEAE 琼脂糖凝胶代替,它不能在柱子上清洗,,3-6 克比较多,那是最大的载量,所以小于 3-6 克都没问题

我想用抗原纯化兔多抗,抗原 50KD。有文献说可以用 CNBr 活化的 Sepharose 偶连抗原,再将抗体结合到柱子上,最后用 PH 2.7 的甘氨酸洗脱。你说用环氧活化的比较好,我想试试,可是我今天问公司,他们说环氧活化的琼脂糖要 1500 块,5g,那么多,我怕到时候不能做就都浪费了。CNBr 与环氧活化对我的实验有什么区别吗??你那有详细的偶连的方法吗?另一个公司提供 100g,2000 块的环氧活化的琼脂糖,价格差别有这么大吗?还是纯度有不同啊?

已经短信回复,肯定是不一样的,100g 的是湿胶,不保护容易结块,而且有水容易活性降低,溶胀后大概 120 毫升,5 克的应该是干粉,1 克可溶胀 4-5 毫升,干粉活性更好保持。蛋白如果碱性条件下不沉淀,那环氧就可以,因为偶连后配基更稳定,不容易脱落,而且有合适的手臂

我现在在做 his 纯化,蛋白包涵体表达,8M 尿素裂解后,离心,上清上柱,先用 8,6,4,2M 尿素 (pH6.0)wash,没有蛋白被洗下来,之后 50mM 咪唑就能洗脱下目的蛋白,有少量杂带,100mM 时也有目的带,但杂带更多.请问这种情况我该怎么办呢?

你想做柱上复性最好先在变性条件下把杂蛋白洗掉后,再开始降低尿素的浓度,然后再用咪唑去洗脱,这样才好,所以你需要先摸纯化的条件,再做柱上复性即可

你好!我通过原核细胞表达产生蛋白质,由于这种蛋白质存在于包涵体中,所以我用高摩尔浓度的尿素提蛋白。蛋白纯化过程我是用 Ni-NTA 柱子纯化的。纯化后进行 SDS-PAGE,发现蛋白分别为 14KD、17KD、26KD、34KD、50KD、70KD,所以想把这些蛋白分离纯化并复性(我本来是用梯度透析方法复性的,但费时,效果也一般,透析后尿素含量仍很高)。想请教一下应该选用何种方法?

我觉得你纯化没做好,至少你应该知道你蛋白是哪个,纯化好后再复性或者在柱子上复性

那我怎么进一步纯化呢？

已经说了,多做几个咪唑浓度,在变性条件下先找到纯化的条件,再在柱上复性,你查查文献或者以前的帖子都有,你蛋白分子量可以根据你的序列算出来的,怎么会做纯化不知道分子量呢,看看柱上复性的操作就可以,纯化可以参考别的公司说明书

我在蛋白质实验方面是个生手,现有两个问题请教一下: 1、以包涵体形式表达的蛋白,包涵体在含有 8M 尿素的裂解液中裂解后离心取上清进行纯化,挂柱后线性梯度的尿素洗涤进行柱上复性,最后用不含尿素的洗脱液进行洗脱,分管回收洗脱液, SDS-PAGE 检测,结果显示只有第二管有蛋白,而且条带较弱。想问一下这种情况下洗脱下来的蛋白是否是复性好的蛋白呢? 2、我直接用洗脱下来的蛋白溶液加到细胞中,发现本来贴壁的细胞全都漂了起来,而且聚集成团。请问一下刚洗脱下来的蛋白溶液用什么方法换缓冲液或改变 PH 值呢? 如果透析的话,用什么透析液呢? 透析后直接用盐酸调 PH 至中性就可以了吗(洗脱液的 PH 值是 8.0)?

多看看复性的材料,通常都是先纯化后再复性或者洗杂蛋白后柱上复性的,样品透析当然最好要和你细胞的环境相似,具体的要求我也不很清楚

我是个纯化菜鸟,在用 QIGEN 的 Ni-NTA 柱子洗脱我表达的融和蛋白,发现低浓度咪唑 10, 20mM 咪唑都能把目的蛋白洗脱,查阅一些资料说可以通过改变 pH 来改变结合强度,是这样吗? 我的蛋白是预测等电点是 4.83,目前用的洗脱液都是 pH8.0 的,怎么样改进呢? 此外,除了在蛋白样品上柱的时候需要摇床孵育 1h 增强结合能力外,洗脱的时候也需要晃动柱体吗? 这样能增加洗脱杂蛋白的效果吗?

我觉得你还是多看看你的操作,也可以参考别的公司的说明书,此外多上点样品,我觉得会不会蛋白量少,高浓度的洗的少,你也可以在变性条件下去做,我不觉得降低 pH 洗脱是好办法.当然你也可以试试

小弟最近准备做镍亲和纯化蛋白,我用的是 AKTA Explorer 100 蛋白纯化仪来进行纯化,有两个问题想请教。第一,选柱:一开始在小试阶段应该选用什么规格的柱子好,还有是否一定要用抗高压的柱子,比如 AMERSHAM 的? 第二,蛋白的紫外检测波长如何确定,是将粗处理后的蛋白溶液直接进行紫外全波长扫描呢,还是有别的方法?

1,可以选择 1 ml 的预装柱小试,当然也可以选大柱子,关键看你有多少填料,要做多少样品,最好是选择能耐压的柱子,进口有国产的也可以。2. 通常都是选择 280 的多,机器好象是固定的. 我现在对这机器不很清楚,你可以参考说明书,或者问 GE 公司的人

多谢 chromatography 兄了,对了还有个问题,您所说的预装柱是个怎么回事? 是不是那种已经装好了的柱子,还是 1ml 的空柱管,因为填料是我自己做的,所以想买个空柱管自己试。

预装柱本身里面就有填料,目前还没空管能连 AKTA 的,所以你有的话,那就没办法了,装大点的柱子吧,或者买这样的小预装柱

小肽分子量约 1—4KD, 文献可以用 sephadex G-25 或 50 的柱子, 还有什么新的方法? 另外谷氨酸敏感的亲和层析柱怎么做啊? 用于纯化膜 NMDAr 受体蛋白复合物, 约 105KD. 谢谢

还可以选择 HPLC 的反相柱, 凝胶柱不会有太好结果的, 如果你的蛋白能结合谷氨酸, 可以买活化好的填料直接偶联谷氨酸即可, 也可以委托公司帮你合成, 其实这比较简单, 你可以选择环氧活化琼脂糖凝胶即可偶连谷氨酸

这里想向您请教一个介质藕联方面的问题. 由于纯化一种蛋白的需要, 目前我要将一个小分子物质 1,6 己二胺藕连到 CNBr 活化后的琼脂糖凝胶介质上. 对于小分子物质藕联的实验过程, 不是很熟悉, 不知是否和藕联蛋白质相差不多? 需要注意些什么? 不知您那里是否有 protocol 帮我参考一下? 还有, 我这个实验要求只能藕联其中的一个氨基, 不知这样的话要控制哪些条件? 能否麻烦您帮我指点指点?

何必这么费事呢, 你可以直接买偶联好的 1,6 己二胺琼脂糖凝胶就可以, 这样更结实, 不断裂, 你买现成的吧. NH<sub>2</sub>- 琼脂糖凝胶 FF 就是这样的填料

不好意思, 你说的这个介质我怎么都没有听说过啊, 是哪家的产品?

GE 的叫 EAH sepharose 4B 就是这样的填料, 我说的那个可以在 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中的目录中有

chromatography 兄, 我看了一下, 这两种介质是活化好的可以直接藕联带-NH<sub>2</sub> 的配基的. 我要的是末端带有自由-NH<sub>2</sub> 的 6 个碳原子的直链, 好象不是一回事

当然一样. 它们都是用你说的己二胺偶连的, 末端是带氨基的, 你想自己偶连也这样, 买活化好的填料连己二胺, 我觉得还是买现成的好

因为最近新买了台 AKTA explorer 100, 急着要开展实验, 大体的方向我自己查了文献, 因为周围无人可问, 所以还是有些具体的问题不是很明白, 望 chromatography 兄指点: 1. 我去询问了一下 AMERSHAM 的 XK 的 16/200mm 的空柱, 看了一下网上的说明书, 他的最大承受柱压是 0.5 MPa 也就是 5bar 左右, 这个最大承受压力是不是太低了一点? 您用 AKTA 做镍柱蛋白纯化时的柱压一般是多少? 2. 我问了下 AMERSHAM 的价格, XK 的 16/200mm 的空柱要 5000 左右, 感觉有点贵, AKTA 上接的一定要 AMERSHAM 或伯乐进口柱吗, 能不能用国产的空柱做代替, 国产的空柱抗压能力如何? 3. 国产和进口的柱子差异究竟在何处呢. 是抗压能力, 还是其他?? 4. GE 网站上说的空柱装柱机是个怎么回事, 装柱时是否一定需要, GE 网站的装柱视频中是否用到了装柱机? 问的问题比较多, 也比较幼稚, 都是些常识性的问题, 希望不要见笑, 因为周围实在没人可问, 再一次感谢

1, 用的时候通常压力不会那么大, 你可以流速慢点即可, 不用担心. 他们的柱子是比较贵, 但是质量是有的, 国产的也可以, 上海华美就有, 缺点是接口和一些细节要差点, 但是价格只有进口的 1/8, 对你做的镍柱子是没问题的. 2, 差别已经说了, 只是有时候接口做的不大细致. 3. 装凝胶柱子需要装柱器, 通常的柱子没必要, 当然有钱准备也好, 没钱可免. 此外机器和柱子等问题尽管问 GE 的工程师, 毕竟那是他们的工作.

我过完镍柱后纯化的蛋白样品过 HPLC 检验纯度，不知道为什么没有挂住，没有我的目的峰出现，我的是 HIS 标签的重组蛋白，您能分析一下可能的几个原因吗？

纯度跑电泳检测即可,不一定非要 HPLC,原因我说不好,现在不做分析,我想也许样品太少,或者吸附太牢没洗下来,你可以多看看有关蛋白分析的文献

我的蛋白含有 HIS 标签，疏水性较强，大部分以多聚体包涵体形式存在于沉淀中，但是用 4 M 尿素就能够把大部分的目的蛋白溶解出来，且从电泳图中可以看出此时的纯度已经能够达到 70% 以上，想用 Ni 柱亲和层析进一步纯化，带着 4 M 尿素过柱，但是挂柱效果不佳，偶尔能挂上一次两次，且试过不同 PH 值和不同 NaCl 浓度，均没有找到直接影响挂柱效果的条件，即使是 HIS 标签包在里面，经尿素溶解后也应该暴露出来，感觉很困惑

改用盐酸胍溶解试试,不少人这样做可以很好挂上,此外你可以选择载量更高的镍琼脂糖凝胶填料,这样也许更好,不是很难做到的

chromatography: 您好，我有个问题想请教一下。我做了一个融合蛋白纯化起来很困难，带 His 标签的，我用的是镍离子亲和层析柱，他总是结合不上，用咪唑根本洗不下来，我现在很急，希望得到您的指导

到底是结合不上还是洗脱不下来,请说清楚点,此外天然情况下难吸附,那就换变性条件下做,也可以换更好的填料,有时候填料作用力弱也可能挂不上

chromatography 兄: 请教一个问题。我用 GST 琼脂糖凝胶 FF 纯化上清中的蛋白，用的是 AKTA 仪器，出来的洗脱液经 SDS 分析非常纯，只有一个条带，但其相对分子量来判断，那根本不是我的目的蛋白，而与 GST 蛋白在同一位置。莫非我纯化的全是 GST 蛋白？而同样的样品，我 SDS 考马染色能看到很明显的条带，WB 分析却能看见两条免疫印迹（分别在 43 和 26 左右）。上清用 ELISA 检测，也是阳性的。穿透液中还有大量的蛋白，会不会所有的融合蛋白都没挂上？或是其他原因，请赐教。补充一下，我将纯化的蛋白也做 ELISA 了，还是阳性。WB 正在做，真是郁闷。难道我的蛋白降解了？但为什么即能被 GST 结合，也能被抗体识别？

样品破碎后要马上去做纯化,此外破碎要温和,如果 GST 融合蛋白没活性就挂不上,我也听客户有这样的问題,但是他样品就是冷冻后再纯化的,所以没挂上,当用新制备的样品就没问題,多试试吧

我想请教几个问题: 1、用 pGEX-6P-1 表达了带有 GST 标签的融合蛋白(包涵体形式),我的靶蛋白有 40KD,请问我用什么样的纯化试剂盒能纯化我的蛋白,并且把 GST 切除掉? 2、我用超声波破菌,500W,10S 破菌,10S 间隔,这样的条件是温和破菌吗? 3、破菌后,分别用 0M,2M,4M 尿素洗涤包涵体,然后用 8M 尿素溶解,经 SDS-PAGE 分析,包涵体已经纯化到 80% 左右,我可以用含 8M 尿素的蛋白质溶液直接上柱吗? 这样高的尿素会影响回收率吗?(也就是说在 8M 尿素的环境中,可溶性融合蛋白中的 GST 有活性吗?能结合到柱子上吗?)

1,通常 GST 包涵体需要复性才能挂上亲和柱子,所以直接包含体估计挂不上,你可以试试,当

然也有的蛋白只 GST 部分是有活性的,那运气就不错,可惜这样的例子很少。2,破碎对不同蛋白不一样,很难有固定的条件。

包涵体中的 GST 融合蛋白,在溶解后是不是不需要复性就可直接做 GST 亲和层析,望指教

你只能试试,大多情况下是挂不上,需要复性再上柱

实验中遇到包涵体纯化问题向您请教!目的蛋白 88kd,表达蛋白以包涵体形式存在,8M 尿素变性后,直接上镍柱纯化,所有 buffer 洗脱液均未见目的蛋白,咪唑及 pH 值洗脱方法都试过均未成功,不知为何原因,特向您请教。我纯化后的实验不需要此蛋白的空间构象,不需复性,无活性的蛋白即可,我还可以通过什么方法得到我的蛋白呢?

把溶解包含体的改用盐酸胍再纯化试试,不少这样的情况下都能解决,我猜测的原因是尿素不能打开的结构而盐酸胍可以,标签暴露更充分,所以能吸附上.如果还不好那需要换载量更高的镍琼脂糖凝胶.通常颜色越深的填料载量也越高,作用力也越强

这段时间试过盐酸胍了,也未能成功,经过电泳检测,发现超声后包涵体(包涵体仅用 pbs 溶解)经过变性就不见了,不知何原因,变性液为:6M 盐酸胍,20mMpbs,1:1000 的巯基乙醇,37 度水浴 3h,经过变性后任何蛋白均不见了,很是郁闷,急需您的帮助!

样品中有盐酸胍跑电泳是跑不出来的,需要透析得沉淀再跑就没问题了,或者可以用三氯乙酸沉淀,我想你的纯化也是这个问题,变性并不需要加温度到 37 度,常温即可

您的意思是变性后需要先进行透析,然后用得到的沉淀跑电泳,这个我理解。可是纯化也需先透析后得到沉淀进行纯化吗,那样会不会使溶解的包涵体又重新形成包涵体呢?另,请问三氯乙酸沉淀需要多少量的要求呢?您的变性常温进行多长时间,抑或是各个蛋白不同,需要自己摸索吗?

因为盐酸胍存在任何样品都跑电泳跑不出来,所以无论是样品和洗脱的部分都必须去掉它才能跑电泳,不是做纯化,包含体没关系的,跑电泳你可以稍微取点加电泳 上样缓冲液处理即可.三氯乙酸沉淀你查书,我不大清楚,因为不同蛋白浓度沉淀需要的浓度也不同.变性我不理解你说多长时间,能溶解就可以

请教一下:我的蛋白的等电点在 PH8-10 之间,我想过一下凝胶层析。蛋白保存形势是冻干粉,有以下几种缓冲液可以选择,请教一下。那种效果会好些,对活性的影响小些:0.1MNH<sub>4</sub>AC,0.05M 磷酸缓冲液,PBS 0.15Mnacl,是不是除了醋酸胺,别的都要收集后加以透析?

上凝胶柱不需要透析样品,我觉得这两缓冲液差不多,但是后者更好点,过完的样品也不一定需要透析,关键看你做什么用途

我表达了一个带 his 标签的融合蛋白,表达量不高,用 ni 柱纯化时可以挂在柱子上,但是用很低的咪唑浓度就可以洗脱下来,难以与菌体蛋白分开,还请楼主赐教是怎么回事,用什么方法解决。还有融合蛋白是强碱性蛋白。

那你也可以用比现在浓度更低的咪唑做阶段洗脱,本身作用力弱只能这样,要不就换填料,此外如果不需要活性也可以在变性条件下纯化,如果本身就是变性蛋白纯化,建议换盐酸胍溶解样品试试

您那有没有葡聚糖凝胶层析方面的资料,我现在正在用 G-15 的葡聚糖凝胶层析,出来一个很高的峰,然后又出来一个爬坡峰,拖得挺长,有点茫然,还请 chromatography 兄提些高见,谢谢!

抱歉,没什么材料,我想后面的也许是小分子物质或者是色素等,你检测一下就知道是什么东西

chromatography, 您好!我最近做蛋白纯化,最后过疏水时在洗脱峰中出现了两个相邻的峰,经过质谱鉴定这两个蛋白为同一个蛋白,我原本以为这是蛋白发生了修饰而造成的,但是今天有老师提出这两个蛋白可能不是修饰造成的而是由于蛋白初提硫酸铵沉淀时所加硫酸铵对其电荷发生了影响,我一直没想明白,硫酸铵能对蛋白发生怎么样的影响呢?我只是在初提时用了硫酸铵,而后面的所有 buffer 中都不含硫酸铵的,难道硫酸铵对我的蛋白影响是不可逆的吗?

这样的情况也许是柱子本身原因或者洗脱过程缓冲液不均匀造成的,在换洗脱缓冲液柱子上不能有残留的以前的缓冲液,这样也许能避免,总之我怀疑是操作本身的问题,而不是什么硫酸铵的影响,你可以多试试,重复一下看看

我重复了三次了,每次都是这样的情况,我洗脱时是采用的线性梯度洗脱,不断减小氯化钠的浓度进行洗脱的.会不会是因为蛋白发生了相同的修饰而只是修饰位点不同引起它们的疏水性质有差异呢?

你的机器梯度混合仪有没有问题,在开始的时候管道是不是清洗,我觉得还是操作的问题,这样的柱子是不可能把细微差别的蛋白分开的,你可以跑 HPLC,位置一样的话那应该是同一蛋白,总之操作本身导致的可能性大

我的蛋白是从昆虫血液中纯化出的天然蛋白,是一种小分子量脂蛋白.我的填料是 Butyl Sepharose 4B,两蛋白峰是基线分离,如图.还请各位帮忙分析分析

如果 HPLC 检测在同一位置,那就是同一种蛋白,只看这图没多大用处,或者跑电泳,在一位置,那也说明是一样的,疏水色谱有时候原理也复杂,特别是填料并非单一作用力的时候,此外蛋白既然电荷分布不均匀,那疏水区域也未必分布均匀,此外出现这样的原因还可能是仪器本身的问题,所以检测最重要,猜测是没用的.首先要做 HPLC 看是不是同一东西,如果是,那就是分离本身的问题

还有一问题请教,有人跟我说我用尿素变性后先进行透析,然后用上清过镍柱,说可能由于尿素变性后直接过柱会出现由于尿素浓度变化使得包涵体过不下来,不知这种说法是否有一定道理,我如果这样做是否会洗脱出来目的蛋白?另外有人用离子交换、亲和层析进行蛋白纯化,您有这方面的操作方法之类的吗,请不吝赐教,再次表示感谢!

应该不是这样的,如果变性都挂不好,透析复性更挂不上,此外做纯化样品别太少,柱子也别太小,否则做出的浓度太低,跑电泳都没有,很难知道什么原因,建议 换大点的柱子,按我说的方法去试试,别的都不好说.此外抱歉,我很难在这里写什么什么操作,你只能自己多看看书或者说明书,要不直接问公司的技术支持

请教关于抗体纯化的问题:pH7.4 平衡 buffer(PBS)~pH2.0 洗脱 buffer(0.1MGly)进行梯度洗脱得到的单克隆抗体,用 1MTris-Cl pH9.0 中和即出现大量沉淀,PBS 透析不能复溶.请教什么样的抗体会出现这种情况, 要鉴别此类抗体需要做哪些方面的验证或者检测?

那你透析 pH,中和 pH 是多少,抗体等电点就在 7-8,有时候选择不好是容易产生这样的沉淀,建议调不同 pH,此外可以加点甘油或者吐温等增加黏度,降低疏水相互作用可以避免沉淀,此外中和的时候为避免局部浓度过高,需要缓慢滴加,同时充分震荡混合好

楼主好, 又来请教! 下一步我准备按照您说的方法用盐酸胍代替尿素重新变性, 进行纯化。但我想请教一下楼主如何才能鉴定出变性剂是否完全打开包涵体, 听说过一种不用 SDS 的蛋白电泳, 不知楼主是否做过这方面的实验, 此实验从理论上是否能用来判断变性剂是否完全打开包涵体, 望指教!

不需要鉴定,经验证明尿素挂不上的蛋白,盐酸胍可以,说明后者变性能力更强,所以标签暴露更充分,没别的原因,至于别的理论我不清楚,至少不少人改变后都做的不错.此外填料本身也要好一些

我想问 chromatography 兄, 有类蛋白在其他物种中已经发现, 我想从另一个物种体内把它分离出来, 并且还具有活性, 你看用什么方法合适呢, 用高效液相色谱法可以吗, 如果可以的话, 您那里是否有此类方法的具体试验步骤, 能否发于我学习。

我没什么方法,你按文献做即可,HPLC 很难得到有活性的蛋白,你还得用常规蛋白质分离纯化的方法,你可以去看看一些实验书和背景知识,在本帖子中有参考书

请教色谱兄, 我正在做一个蛋白质分离纯化的最后一步, 目标蛋白在 6k, 杂蛋白主要在 20k 以上和 3k 左右, 还有些盐。为了达到液相色谱检验要求, 我选择了 G50 作为分离手段。但实验室条件有限, G50 填料已经用了两年了, 没有装柱器, 也没有水平垂直仪, 没有蓝色葡聚糖, 填料倒没有长菌。我将填料煮了一下再用 NaOH 浸泡后以铅垂为标准灌柱两次, 灌的是小柱 (0.8cmx22cm), 用去离子水作为流动相, 流速是 5s/d, 上样 2mg, 250uL。跑下来都是全排阻出峰, 没有一点截留效果。这是为什么呢? 是柱子太短还是填料寿命已尽呢?

柱子至少装超过 60-100cm,也可以选择离子交换等方法试试,凝胶柱也未必能很好分离,实在没办法也可以试试离子交换.过 G50 如能去掉 20k 以上的,剩下的可以选择 G25 分离,总之实验不好预测,只能多试试,如果没办法也可以选择 HPLC

现在纯化 SDS-PAGE 发现两蛋白分子量为 400KD 与 250KD, 请问是否可以用凝胶过滤分离这两种蛋白, 选用那种填料比较好呢? 非常感谢! 经费原因想用自装柱, 现在想用 G-200, G-150 可以么? 这两种蛋白都想收集到, 谢谢!

50 或 75 也许更好,后面的范围太宽,效果不会好的

我现在在做单抗的抗原,但是纯化不了,蛋白不挂柱,蛋白存在于穿透液和前期洗脱液中  
我的蛋白是 96KD PI5.5,用的柱子是 profino Ni-TED,我试过降低盐浓度,将 NaCl 浓度由 300 降到 100,和 PH 调高到 10,但结果还是一样

建议换填料,因为你的填料作用力太弱, Ni-TED 只有 1 个组氨酸结合位点,Ni-NTA 两个,Ni-IDA 三个,所以后者作用最强,建议用普通的镍琼脂糖凝胶试试. [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载下有说明书

请教 chromatography,我的目的蛋白是 75kDa, PI 值为 5.5 左右。我用过 PH7.0 和 PH8.0 做溶解缓冲液并过阴离子交换柱,结果证明后者可以除去更多条带。但是分离纯化后的样品有很多杂蛋白,本打算用 MonoQ 进一步分离,但杂蛋白太多不宜过柱。我尝试过疏水性分离,但失败了。现在不知道该怎么继续实验了,不知道您是否有好的建议。(对了,我的蛋白在细胞内可溶部分,但培养后的菌液低温下存放两星期后同时存在于上清和胞内, SDS-PAGE 结果显示上清样中杂蛋白较少。上清和沉淀我都做过纯化,但是结果都不好)

我觉得你还是上 MonoQ 会更好点,此外离子交换除改变 pH,洗脱可以优化一下,实在很不好回答这样的问题,我觉得做纯化还是需要多读点色谱的书,否则不会变化,一旦做不好就束手无策了,而我其实也帮不了什么忙,你只能自己根据理论条件上做点优化,多尝试没什么更好的办法

请问楼主:您在纯化的过程中有没有碰上阳离子和阴离子柱都挂不上的蛋白呢?用了疏水柱也没有挂上,不知道是怎么回事,应该怎么办呢?

没遇到过,我想也许是条件不合适,你可以适当降低缓冲液浓度试试,我曾经遇到浓度大于 5mM 就挂不上的,此外样品本身盐浓度或 pH 是不是也留意一下.疏水可以选择苯基,硫酸铵浓度可以高点试试,同样要留意 pH 的问题

非常感谢楼主,但是我的蛋白是一种酶,在低浓度尿素条件下仍有活性,我不想做复性,复性后有活力的酶回收率太低,目前想请教一下, pH 值对 Ni 柱亲和层析的影响是否很明显,我已经挂上过两次,而且纯化的效果还不错,只是一直也没有重复出来,有点怀疑 pH 值的问题

pH 7-9 应该都可以,那你就看看前两次什么条件,也许你的填料需要再生,还不行,那只能换填料

那家公司的肠激酶信价比较高,还有就是肠激酶的一般用量以及使用时应注意的事项,谢谢楼主!

没用过,可参考:

[http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Protease\\_fusion\\_cleavage/Novagen\\_Enterokinase.pdf](http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Protease_fusion_cleavage/Novagen_Enterokinase.pdf)

Chromatography 兄：我的 DEAE sepharose 柱料在再生以后变得带些黄色，怎么处理？谢谢了，还有请问这种柱料能煮吗？

用过的填料,特别是碱处理后的填料就这样的,回不到从前的白色了,只要不影响载量,那只能这样用,可以在中性条件下煮,但是这样处理怕也白不了

我纯化 GST 偶联的蛋白做抗体，想用 HPLC 进一步纯化得到更纯的抗原，请问 HPLC 纯化后蛋白变性对于抗体的产生有没有影响，多谢楼主！

变性的蛋白做抗原应该是没问题的。

楼主您好,我是个做蛋白的新手,有个带 GST 标签的蛋白准备纯化,有些问题向您请教:我的融合蛋白 pI/Mw: 5.26 / 22316.97(网上算的),以包涵体形式存在,我还没有开始做纯化,希望您能帮我提供一个大概的纯化思路。再有就是最近打算买 GST 的亲柱子,不知哪个公司的好一些?最后的蛋白要去掉 GST 标签该怎么做?

GST 标签的蛋白如果是包涵体理论上是不能直接亲和纯化的,需要复性或者是可溶性表达的才行.亲和柱和填料可选择国产和进口的,具体的厂家我不好推荐,因为我用的都是我们自己的产品,去标签可以直接在柱子上切即可,多看一些相关文献或厂家说明书即可

chromatography: 您好! 我做的是 GST 融合蛋白的纯化,融合蛋白 69.9kDa,PI:9.195,纯化结果如图,发现用 10mM GSH 可洗脱杂蛋白,而目的蛋白洗不下来。由于融合蛋白与树脂结合能力比较弱,我是将上清与树脂混合过夜的。此外,我也用低温诱导,可溶性表达很高时纯化也出现上述情况.加大 GSH 到 20mM 也不见改善. 不知是否目的蛋白沉淀在柱上了?洗脱液 PH 加 GSH 后调至 8.0,结合缓冲液用的是 PH7.4 的 PBS。请问我该如何改进?

用平衡缓冲液多洗几个柱体积,样品一定要离心过滤再上样,如果蛋白浓度不高,不适合填料混合样品,直接过柱子的好,此外样品一定破碎后马上纯化,破碎也要温和,总之要注意的问题有不少,而且平衡缓冲液中要加 0.5M 盐也许更好,这些注意的问题自己去排除一下,希望能有好结果.图很明显是填料吸附太少目标蛋白,所以洗脱后浓度太低,电泳跑不出来,建议多用填料,多上样,分管收集,这样才好

请教色谱兄，一般的层析填料能不能水煮？离子交换、金属螯合、凝胶过滤、亲和层析的填料能煮吗？我突然想到物理化学里讲到的饱和蒸气压原理，假如水煮凝胶过滤填料的话(例如 sephadex-G50)会不会由于蒸气泡在凝胶内部的微孔中形成而将孔洞撑大而导致凝胶变成全通透呢？我实验室的 G50 就是煮过多次的，我跑了好多次都没有截留效果

离子交换、金属螯合、凝胶过滤能煮,但是那也需要仔细看说明书,如果不好的厂家的那就不好说,亲和层析的填料品种很多,最好看说明书,通常煮不见得有什么好处,所以需要特别小心.气泡不会将孔洞撑大的,你的实验也许另有原因,不是填料不合适或许是填料需要清洗

我也有问题请教。我现在在纯化一个融合蛋白，需要过 G-25、DEAE、疏水和亲和，G-25 的收率比较高，但 DEAE 对目的蛋白的收率只有 55%，疏水只有 30% 左右。请问，如何提高这两步的收率？

这样笼统的问题通常都不会有太好的答案,我觉得你只能通过检测看到底是损失在哪里,这样才能找到合适的方法,此外你的纯化如果步骤越多,收率越低,其实你也许可以先过亲和,或者疏水,这样不需要除盐,效率也高。

我的蛋白是 16kd 大小的,用 15%的胶跑出来会有拖带现象,应该不是蛋白降解,因为蛋白一纯化出来就跑胶了,不知道是何原因。还有就是,我的蛋白是 his 标签的用洗脱液洗下来,如果放 4 度冰箱就会有沉淀,沉淀经检测不是蛋白质,不知是何原因。洗脱液的成份是氯化钠,磷酸氢二钠,咪唑,吐温 20,还有水

1,电泳的电压或者电流别太高,少上点样品,蛋白浓度也别太高,多看看电泳的书。2.沉淀也许是咪唑,如果沉淀不是蛋白,那取上清即可

今天过了反相柱后,电泳又不拖带了,而沉淀中也有蛋白。我想应该不是电压或电流的问题吧

如果这样,也许你的样品浓度过高,导致上样出现问题,不要浓度太高,沉淀如果有蛋白,那就留意看看蛋白保存的条件,我觉得你还是要注意样品做完透析再跑电泳的好

我是个新手,现有一个蛋白复合体,用凝胶电泳分析三个部分:名称 分子量 pI 1st band 18.0KD 6.68, 2nd band 13.5KD 5.47, 3rd band 12.2KD 8.2。没有标品,如何用毛细管电泳分离并相对定量。不用毛细管凝胶电泳行不行

普通电泳也应该可以的,此外毛细管凝胶电泳你可以问问做这分析的人,我不是很清楚

柱上复性问题:一个包涵体表达蛋白,8M 尿素变性后上:第一种方法,直接 IMAC 柱,然后阶段洗脱,3 步洗脱,缓冲液中尿素浓度逐渐降低,咪唑浓度逐渐升高,吸出的蛋白浓度非常高,达到 4ml/ml,电泳纯度很高。第二种方法:第一步,上 IMAC 柱,也是分步洗脱,也是 3 步洗脱,缓冲液中尿素浓度不变,咪唑浓度逐渐升高(与上一种方法咪唑浓度升高浓度相同),吸出的蛋白浓度不高,达到 4ml/ml,电泳纯度有杂带。第二步,上 Q 柱,分步洗脱,也是 3 步洗脱,电泳纯度稍有杂带。第三步,Q 柱样品适当稀释,上 G-25 柱脱盐,脱盐后,样品有时会因为上样浓度,没有调整合适而发生混浊,洗脱后的浓度居然只低到 0.1-0.2 左右。真的很奇怪,有很多不解,为什么之前浓度高达 4ml/ml 也没有发生混浊,可是低浓度却发生混浊呢?

也是由于前面的都有少量的尿素所以不沉淀。一旦去干净了就沉淀了。

我们有 sigma 的多肽 flag-peptide 说明上说用 buffer 溶后要放于-20 保存但给我的老师说放于 4 度我在 4 度放了半年了,刚看说明发现放 4 度不行,您说还能用吗?肽浓度是 5mg/ml 组成是 Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys

你可以试用一下看看,如果是干粉,那 4 度应该没问题,液体就不好说了

请问,我在做一个 HIS 标签的蛋白纯化,该 KDR 蛋白的分子量 10KD 左右,用的是美国

GE 公司 AKTA 仪器, 1mlNi 柱, 10\20\50\100\200\300\400mM 咪唑分段洗脱。第一次, 样品没有加咪唑, 也没有加甘油和氯化钠, 50mM 咪唑时候, 尚能收集到一些不纯的目的蛋白。为优化样品, 第二次样品中加了 5mM 咪唑、200mM 氯化钠, pH7.4, 没有收集到目的蛋白。第三次样品中加了 5mM 咪唑、400mM 氯化钠, 5%甘油, pH7.4。没有收集到目的蛋白。(与第二次同时制备的样品, 间隔时间多了几天, 所以再第四次) 第四次样品中加了 5mM 咪唑、400mM 氯化钠, 5%甘油 pH7.4。没有收集到目的蛋白。第一次曲线有一个如土丘样的峰, 后面的几次在差不多 50mM 洗脱时候有峰, 挺好看, 但 SDS-PAGE 没有见到目的蛋白。可否请教, 蛋白样品应该怎样优化? 才能效率较高的得到目的蛋白呢? 是否 bufferI(平衡)与样品的咪唑浓度必须保持一致呢?

怀疑样品加咪唑后作用力更弱, 这样洗脱的浓度太小, 所以电泳没办法检测, 建议别加咪唑, 只加 400mM 氯化钠, pH8.5 缓冲液即可。此外加大上样体积, 降低流速, 0.5ml/min 上样, 按 10-20mg 目标蛋白过柱子, 轻易别用甘油, 黏度大, 影响样品吸附。洗脱 20\50\100\200\300\400mM 再试试, 或者换大点的柱子, 有时候柱子太小做出的样品少, 难检测

我现在纯化 GST 融合蛋白, 过 GST 柱之后有很多杂蛋白, 杂蛋白用 Q 柱也去不掉, 预测 PI 为 4.99, 我该怎么办? 请色谱兄指点

最好注意样品处理, 从破碎到提取, 离心过滤再上柱子, 而且样品不能放时间过长等, 杂带的的原因很多, 优化亲和纯化的条件为主。此外这表达系统容易有 26KD 左右的 GST 杂带, 亲和很难去除

我是刚进实验室没多久的研究生, 有很多地方不懂, 我想请您请教一下, 色谱就是层析吗? 我想做磷酸化蛋白的富集, 搜到您的帖子说要用铁离子琼脂糖凝胶, 我想请问一下: 1, 做磷酸化蛋白的富集用普通的亲和层析可以做得到吗? 2, 文献上说的固相金属离子亲和色谱应该用什么仪器来做呢? 3, 如果铁离子琼脂糖凝胶电泳能够富集磷酸化蛋白, 那么应该用什么洗脱磷酸化蛋白呢? 您那有详细的步骤吗?

色谱就是层析, 叫法不同而已。1. 不明白, 亲和种类很多, 所以不知道你指的什么, 普通的亲和是肯定不能用于它的纯化的。2. 可以手工操作也可以用机器, 我不知道文献怎么说的。3. 洗脱就按给说明书上写的那样, 可以参考<蛋白质纯化与鉴定实验指南>265 页。材料也可以参考 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 的资料下载, 其中有这部分的操作。建议要想做好实验最好能系统看看一些蛋白纯化的书, 否则很难做好

我是一个试验新手, 最近在提取一种蛋白, 可是我原作者的博士论文做过但过镍柱的目的蛋白的峰低而缓; 而上第二个柱子: 葡聚糖 G-25, 接的蛋白浓度很低, 而且峰低又小, 蛋白量很小。不知错误在哪, 也没跑电泳呢。请求楼主帮帮忙: 失败的原因在哪? 应该怎样改进? 有没有镍柱的使用说明, 急求!

[www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载中有镍琼脂糖凝胶说明书, 也可以用于同类的填料。最好是选择镍亲和柱, 别的都难有好效果, 洗脱低可能上的样不够或者填料吸附能力弱, 原因很多, 首先要确定是不是能吸附你蛋白, 再说洗脱, 可以选择作用力强的填料效果也许更好, 如果都挂不上, 那你只能在变性条件下去纯化

你好，我想请教一下我纯化蛋白质的时候过离子交换层析柱之前有蛋白，过柱之后收集的洗脱液里面却检测不到，到底是哪里出错了呢？每次检测的时候都是用 SDS-PAGE 电泳检测，而且洗脱时候用离子强度逐渐升高的方法！

洗脱后的也许盐浓度过高或者样品浓度低的话需要除盐浓缩后应该就没问题

chromatography: 你我用的亲和是蓝色葡聚糖，说明书上说是在低盐情况下上柱。而且即使先过了疏水，我的疏水洗脱峰是  $0.5\text{M}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，再上 DEAE 的话仍需脱盐，所以我的上柱顺序是 G-25---DEAE---疏水---亲和，如果样品好的话，是不用亲和 的。哦，我的样品是酵母发酵液上清，是无机培养基，所以盐度高，要先用 G-25 脱盐。你认为我的次序应怎样调整呢？

也许你可以先过疏水—G-25—亲和，或者 G-25—亲和，其实没固定的模式，你可以配合电泳和自己样品的需要去优化，这里其实只能讨论细节的问题，而方案其实是不好说的

你好，我有问题向您请教：我的蛋白为融合蛋白，大肠杆菌可溶表达，分子量为 55KD，经过 PH8.0 的阴离子交换柱后的情况是部分流穿（目标蛋白纯度为 60%），部分洗脱，同时也 试过 SP 柱也是以上结果，还有疏水的也是如此，分子筛也基本没有效果，在每一步洗脱中都存在目标蛋白，还有一个怪现象是破菌上清做硫酸铵沉淀后目标蛋白很 难溶解

主要还是洗脱条件的优化，配合电泳或活性测定找合适的盐浓度把杂带和目标蛋白分开，很粗放的线性梯度很难做精细的分离。沉淀蛋白很容易变性，所以需要低温，时间不能过长，沉淀要缓慢加硫酸铵等，太多常识问题，可惜篇幅有限，没办法一一说清楚，所以还是需要大家自己去系统看看色谱的书

chromatography 您好，有个问题想问您，我用的是 millipore 的超滤离心管将未与  $\beta 2$  微球蛋白结合的生物素给过滤掉，可是如何才能知道离心后  $\beta 2$  微球蛋白的浓度呢？

用蛋白定量的方法不就知道了。如 B C A 法

我也想问楼主一个问题：我在做上 HIS 亲和层析的时候，杂蛋白还是很多，能不能再将纯化的样品重新上样呢？谢谢。还有一个问题：用 GST 纯化后切掉标签的实验好做吗？成本也很高吧？

可以，但是需要先咪唑或者稀释样品，此外需要用不同浓度的咪唑做阶段洗脱，如果不优化条件还和以前一样难有什么改观。切标签应该算好做，关键看酶切位点。成本对实验室来说应该能接受

我的蛋白是 GST TAG 的,用 GST 柱纯化,有很多杂带,我在 binding buffer 中 加了 500mM 的 NaCl, 或 0.5% 的 TWEEN 20 没有任何效果我超声的条件是 200W 3 秒—6 秒—40 次。我蛋白的 挂柱效率不高，超声是加 DTT 也没有效果，为提高挂住效率，在洗脱前，我将裂解物与柱填料孵育 2 个小时。杂带用 Q 柱也去不掉,预测 PI 4.99.我该怎么 优化纯化条件？

好象已经回复过了,要注意样品本身的问题,此外洗杂带的时候要多洗几次,样品要离心过滤

等,只能自己去找找原因,超声要温和,破碎后马上处理就纯化.改变条件试试

chromatography 兄,你好!我问个问题,也是困扰我很长时间了!我粗提的多肽,但里面含有很多的糖,不知道用什么柱子纯化比较好?我的样品量 100g 左右,想用离子柱,但不知道哪种比较好,也不知道哪个的上样量可以达到这个分离量?多谢指教了

不知道肽等电点是没办法选择的,也许你需要强阳或者阴柱子试试,最常用的是琼脂糖凝胶类的填料,如果肽稳定也可以选择树脂,那样更便宜

谢谢指教了!我再弱弱的问个问题,因为其他地方没有查到,就是强阳或者阴柱子比弱阳或者阴柱子有什么好处?只是耐受PH的范围增大了吗?还有你所提到的琼脂糖凝胶或者是树脂的上样量能达到 100g 吗?还是多次上样?或者是用比较大的柱子?希望继续指教

是强阳或者阴柱子比弱阳或者阴柱子有只是耐受 PH 的范围增大了,选择什么看自己的喜好,但是其实在结构上是有一些细微差别的,其实选择什么只要能达到分离目的即可.上样量有时候很难预测,特别是肽类,你需要做小试,然后计算放大才知道,因此现在预测是没意义的

请问楼主做过 Q Sepharose High Performance 离子交换层析吗?一般的步骤是怎样的?对这个柱材怎么处理?

做过,不需要特别处理,新的填料装柱平衡后直接上样即可.其他步骤和通常的 Q Sepharose FF 的一样,你可以参考说明书即可,或者直接问卖给你填料的厂家

我有些问题是关于纯化抗血清的,望不吝赐教.我是用 GST 融合蛋白免疫兔子,得到了多抗.希望除去抗体中抗 GST 的部分.仅留下抗 32 肽半抗原的部分.计划:抗血清先用硫酸铵法纯化得到 IgG,然后用亲和层析法纯化去除抗 GST 抗体,方法有 3 种,1. 将小肽偶联到溴化氢活化的 sepharose 4b 上,直接将抗血清过柱,得到纯的抗体.2, 购买 gst-sepharose 预装柱,将抗血清过柱,收集未与柱料结合的抗 32 肽抗体.3, 用现有的 glutathione-sepharose 4b, 表达 gst 蛋白上柱使之结合,用抗血清过柱,收集未与 gst 结合的抗血清.4. 将表达 gst 偶联到 sepharose 4b, 再用抗血清过柱.我应该怎么做才好?注:从公司购买的半抗原量有限 10mg 左右,本人从未做过偶联柱料等方面的工作毫无经验.那种方法最好?

问题是如果你用 GST 融合蛋白免疫兔子,有一部分抗体即抗 GST 融合蛋白同时也抗 GST,又抗你的抗原,这样你说的方法都很难得到只抗抗原的抗体,我觉得你最好是固定 GST 融合蛋白,我觉得倒可以考虑用融合蛋白去免疫后,再偶联融合蛋白得到抗体,再用空载体的 GST 偶联填料去除只能和 gst 结合的抗体,但是能剩下多少抗体就不清楚.如果你的抗原本身有免疫原性,最好的方法还是得到抗原直接免疫最好.然后再用亲和去纯化

我做了一些蛋白质的水解液,想分析其中的活性物质,第一步我想粗略的分离一下就可以了,比如通过超滤分成几个分子两段的,然后分别测其活性,但是我用 3K 和 5K 的超滤离心管进行分离好像效果不是很明显,而且那个管子用了一次竟然就破了,好郁闷.所以我想请问一下楼主,有没有什么好的建议和办法让我把这个水解液按照分子量不同分成几个部分?如果一定要用超滤的话,应该用什么装置?滤完一次,超滤装置应该怎么处理才能复原?

3K 和 5K 的超滤离心管进行分离几乎是不可能的,我觉得最好还是选择 HPLC,真没特别好的方法,通常的凝胶柱子是很难分开的.超滤的问题看你选择设备而定,最好是问厂家

chromatography 兄: 我们现在用自己纯化的抗体通过 CNBR 做成亲和柱纯化我们的目的蛋白, 抗原挂不上柱, 但是抗原抗体的 IP 结果很好的, 现在不知道问题出在什么地方? 会不会与抗原结合的位点被包在里面了, 所以没法结合上

也许你偶连的抗体太少,或者活性太弱,因此吸附的少,通常单抗需要偶联 5mg/ml,多抗至少需要 10mg/ml 左右也许才能有好的效果

chromatography 兄: 我们在做蚕的丝线, 蛋白样品很粘, 有很多胶原、糖类和脂类, 而且样品量不大, 想问问有没有什么好的处理办法, 便于上柱

这样的话最好能先粗提蛋白,如果没办法做到,那只能稀释上样,没什么更好的方法

你好, 我想请问一下关于生物素标记蛋白的问题, BNHS 分子酯键中的-C=O 基团可与蛋白质分子中赖氨酸的氨基形成肽键, 从而使蛋白质标记上生物素。β2 微球蛋白能用该种生物素标记上么? 非常感谢!

应该可以,只要有氨基就行

我想继续请教一下 β2 微球蛋白氨基酸构成中含有赖氨酸么? 因为我在网上查到 BNHS 需要和赖氨酸中的氨基形成肽键啊, 是不是其他氨基酸不行呢? 或者在哪能 查到蛋白质的氨基酸构成呢? 我按照 β2 微球蛋白:BNHS 为 1: 45 (摩尔比) 的比例标记过一次, 可是没有标记上, 请老师赐教

有氨基就可以,至于有没有赖氨酸我也不清楚,通常有氨基就可以,我不知道哪里可查,你发外面问问,标记的时候留意 pH,需要 6-8,当然偏碱性会好点,你可以参考文献,尽量多用点 BNHS,延长时间

chromatography 老师好, 上次曾经向您请教过 β2 微球蛋白和 BNHS 标记的问题, 现在的问题是蛋白已经标记上了, 可能是 β2 微球蛋白和它的抗体不反应, 蛋白和抗体都是从晶美公司定的, 由于我做的是芯片, 晶美的技术支持说我购买的抗体说明书上写了该抗体能做 ELISA, 其他实验都不确定。因此我 想请教一下, 有哪种方法最简单最快捷的能检测出该对抗原抗体能否反应? 由于做的是蛋白芯片, 对这些知识了解不是很多。

那你可以直接先做 ELISA 看抗体本身是不是有问题,如果没问题,再用标记的样品试试,如果前这就有问题,那就是抗体的原因

chromatography 您好, 问题是目前我只买了 β2 微球蛋白和它的一个抗体, 如果要做 ELISA 的话, 不是还需要再买一个抗体的吗? 我的想法是就用现在这个蛋白和抗体能检测出它们是否能反应么?

那你可以问提供抗体的公司怎么检测,我不是很熟悉这块

我是一个新手，最近一段时间纯化蛋白，很是不顺，希望您能够给我指点迷津，我的问题是这样的：我纯化的蛋白是 His-tagged 的，原核表达，电泳检测诱导出来了，而且在上清里面，细菌裂解液用的是纯化时的结合缓冲液 (PBS)，其中含有 10mM 咪唑，另外，加了 Triton 和 PMSF，超声裂解。纯化的柱子是自己放的填料 (resin)，自己配的 0.1M 的 NiSO<sub>4</sub>，我按照 Amersham 公司的说明书进行纯化，平衡柱子用的也是含有 10mM 咪唑的 PBS，洗杂蛋白用的也是这个，之后洗脱用的是含有 300mM 咪唑的 PBS，pH 值都是 7.4，我先纯化野生蛋白，纯化出来了，但是在纯化突变蛋白时却没有洗脱出来，突变蛋白只是野生蛋白突变了一个氨基酸 (谷氨酸变为丙氨酸)，后来我把一部分柱子 (resin) 加了蛋白电泳上样缓冲液，然后用沸水煮 6 分钟，电泳检测，发现洗脱液在目标蛋白地方只是出现了两个很细的条带 (而野生蛋白则是出现了很浓的一坨条带)，但是 resin 条带在目标蛋白地方则出现了很浓的一坨条带，说明我的突变蛋白是挂在了柱子上，但我不知道为什么洗脱不下来。好像加大咪唑浓度效果也不太好，希望你能够告诉我这是为什么呢？

那你可以改变平衡和洗脱的 pH 到 8 试试，会不会蛋白在 7.4 溶解不好，此外也可以洗脱的时候把 pH 降低到 5-6。咪唑浓度一样或者提高到 400mM，这样应该就没问题

chromatography 老师请教一个问题：用 NaOH 处理过的 DEAE sepharose ff 胶，再用水洗至中性后装柱，再用 pH7.5 的 Tris 缓冲液平衡，可是流出液的 pH 竟然是碱性的 (pH 试纸测定)，什么原因导致的？柱料使用不超过 5 次

多冲几个柱体积就好了，因为 DEAE sepharose ff 可以吸附 -OH。所以通常要大体积的才能洗到中性，你可以加大浓度或者缓冲液中加盐，这样就容易到

请教一下糖蛋白纯化问题。我想从一种植物粗提物中纯化一个蛋白，分子量约 25kD。改蛋白是一个 O 糖基化蛋白，文献介绍有 3 个半乳糖 (galactose)，9-16 个阿拉伯糖 (arabinose)。电泳显示有两个主带，附近有弥散。我想是不是可以用 con A 之类的糖蛋白亲和层析进行纯化，不知道具体该选什么填料，因为好像不同填料对糖基的亲合性不同。韦氏公司上提到了两种亲和填料，但都没有说明适用类型，也没有使用方法。

你可以查文献，半乳糖也属于吡喃糖，所以应该可以用 con A 琼脂糖凝胶

有个问题困扰我很久了：我的重组蛋白是由 A.B.C 三个亚单位组成，His-Tag 位于 C 上，但是三聚体结合不紧密，E.coli 表达后如何纯化获得有活力的三聚体？

那看亚基之间是什么作用力，只要不破坏就应该可以，你只能查文献自己多摸索去解决，如果不清楚是很难做的

1) 我的表达蛋白包涵体开始用 UREA 溶解，总是溶解不完全。改用 盐酸胍后，溶解地很好。但是在透析地过程中，出现了大量沉淀，而以前用 UREA 地时候，梯度透析下来，几乎没有沉淀，这个可能是什么原因呢？透析液最后的成分是 TGE+GSSG+GSH。2) 蛋白复性后上 Sephacryl S200，结果出来，和蓝色葡聚糖差不多的保留时间，也就是可能形成了一个大的多聚体，我现在无法判断这个多聚体是天然的形成，还是在柱子上蛋白聚集而成的，因为我过柱是在室温条件下过的？过柱产生的峰，跑 SDS 是有目的蛋白的，但是跑非

还原的 PAGE, 什么都没有。是否还有什么方法可以判断这个多聚体的性质呢? 3) 还有一个关于 native page 的问题, 是否有 native page 使用的标准蛋白质呢?

盐酸胍变性更彻底, 溶解更好, 浓度也自然高, 复性不适合很高的浓度, 因为这样容易沉淀。Sephacryl S200 分离范围不小, 所以精确知道和蓝色葡聚糖的差别, 这样做意义不大, 至于电泳我就不清楚了

向 chromatography 兄请教一个仪器方面的问题, AKTA EXPLORER 的泵清洗有 2 根管子, 在机器运转时, 会自动的一个进一个出以次来清洗泵, 但最近我发现清洗泵的两个管路中老是有空气, 而且管路中液体的流向也是一会进一会出的, 难道是因为泵中有空气的缘故吗?

如果这样, 那你需要排气后才行, 有空气液体就输送困难, 如果你不清楚可以问周围熟悉的人, 没有的话那直接问 GE 的工程师

我现在想纯化一个糖蛋白, 从植物中直接提取的, 现在得到了粗提物 (已经过硫酸铵沉淀, 并透析), 但是夹带的杂质比较多 (比如色素, 多糖), 我想用离子交换柱做初步的纯化, 把色素和多糖去除是否可行呢? 还有一个关键问题, 我的蛋白还是未知的, 所以弄不清楚该用阳离子交换剂还是阴离子交换剂, 我的笨笨想法就是两个都试验一下, 不知道您的建议是什么?

实验很难预测, 你对自己蛋白都不了解我更不清楚, 所以只能试试才知道, 等你有具体问题再讨论, 可以自己多看看相关的材料

请教 chromatography: 我想过阳离子交换树脂纯化一下小分子肽, 因为不知道等电点是多少, 就把起始缓冲液的 PH 调到 3 左右, 保证它带正点, 但是不知道刚开始的离子浓度应该多大才可以, 有人有 mmol 级的起始浓度不知道是否可以啊? 还有就是最后的缓冲液终浓度达到多少才可以保证所有的肽全洗下来? 就是一般大家所用的盐的离子浓度会是多大?

等电点不清楚是很难知道什么 pH 及缓冲液浓度合适的, 你只能在 7 分别用阳柱或者阴柱试试, 通常缓冲液浓度 10-20mM 即可

不好意思我太心急了没有说明白! 是这样的, 我原本想只纯化一种样品的, 但是由于粗心拿错了, 拿了两种不一样的样品, 就这样加进去了! 我现在还在纳闷怎么会那么粗心呢! 洗脱的时候会怎么样呢? 我过的是离子交换层析柱!

那就很难说了, 你只能洗脱试试, 如果分不开, 那样品也许就废了

你好, 我想请教一下: 我想从蛇毒中提取一种蛋白, 最开始做的 DEAE A-25 是从洗脱峰出来, 后来做了 G-100 分子筛, 该蛋白质是在第一个峰, 接着做 CM C-50 图谱很漂亮, 就是一个单一峰, 但是 SDS PAGE 跑出来仍然和 G-100 的一样, 是两条带. 现在时间很紧, 老板又要我赶快拿出 HPLC 的单一图谱, 上次跑了一次 HPLC, 出来很多杂带. 我现在感觉很棘手, 两种猜测: 1 这是一种物质的两个亚基, 因为它们的分子量相差比较大, 约 30~40KD. 但是做了几次酸性电泳都看不出来是不是一条带, 2 该物质还是不纯, 应该还选一种阳离子的填料再分离一次. 如果现

在能选一种适合的填料分离出来是最能说明问题,但是实验室没有其它填料了,除非有十足的把握老板不会同意再买填料。所以我想问一下我第一种猜测是否可靠,如果再选填料哪种比较好?

那你只能用不同的盐浓度在做 DEAE A-25 柱时用阶段洗脱去优化,凝胶柱子也是如此,尽量少上样,流速慢点,你又没别的填料,只能自己多摸索了,过了 DEAE A-25 再过 CM C-50 没什么意义的.如果这两个柱子分不开,你要不用新的方法很难分离.至于你猜测我不很清楚,你还是需要多看看文献

感谢 chromatography 老师,不好意思我上面写错了,过 DEAE A-25 是从穿透峰出来的,CM C-50 分离不出来,那有没有其他比较适合的填料呢?

换再多的柱子也没意义,你需要做的是优化纯化的条件,多看文献看有没有更好的方法再换填料.你可以配合常规方法如硫酸铵沉淀,还可以试试疏水色谱,常规的也就这些方法了

SDS-PAGE 电泳 LOADING BUFFER 配出来后,不是蓝色的,而是偏红,怎么办? 还没有加 2-ME。(配了好几次都这样), 高手请帮帮忙!!

应该是 pH 不对

楼主 你好! 我用杆状病毒表达系统在昆虫细胞中表达蛋白,带 HIS 标签,但是用镍琼脂糖怎么也纯化不出来,过柱后目的蛋白挂不上去,而纯化原核表达的带 HIS 标签的蛋白却很好,是不是由于真核表达后蛋白修饰过度, HIS 标签包在里面,不能结合到金属离子上。如果是这个原因有什么方法能够解决,万分感谢

如果是这样,你只能选择更强的填料,不知道你现在的填料是什么,如果填料本身已经是最强的都挂不上,你只能在变性条件下去纯化

我的蛋白过 source Q 时,拉剃度(盐浓度从 100mM 到 1M,拉了 90 分钟)时目的蛋白峰很小,用 6M 的盐酸胍却能洗出很多目的蛋白,我用的 buffer 是 MES,PH6 附近,请问该怎么解决?

也许是你的 pH 选择不合适,蛋白沉淀,所以才如此,你换个缓冲体系,提高 pH 到 7-8 试试

层析实验中,重现性不好的问题想请教您! 我用 DEAE Sepharose FF 凝胶分离蛇粗毒,上样量约 0.5 克, 20mM Tris (pH7.6) 平衡,用带 NaCl 的 20mM Tris (pH7.6) 梯度洗脱,但是这几次结果都不一样,最初 9 月份的时候做过两次重现性都很好,但是这个月以来一直都不好。想请教您是什么原因?

信息太少了,很难判断,因为可能的原因有不少,首先柱子要一样,此外多留意操作看和以前有什么不同,此外填料本身有没有问题,你只能自己多去思考排除了.线性洗脱本来也难重复,对仪器和操作都要求比较高,所以最好要每次条件都一样

我想用 sephadex LH-20 分离一个刚过了 sephadex G25 的一个峰,成分可能是多肽,因为在 280nm 下监测得到的峰,分子量<5KD,又得知 LH-20 是要用有机溶剂洗脱的,因此好像不

能用核酸蛋白监测系统监测，请问有没有什么方法可以检测我的 LH-20 分离组分阿？

通常的乙醇,甲醇等,用核酸蛋白监测系统监测应该可以,只要管道没问题,同时 280nm 有吸收即可.此外也可以用 HPLC 检测

我又遇到新的问题了，SDS-PAGE 凝胶不凝是怎么回事？原来半小时左右就可以凝固，现在几天都不凝！用的试剂都是新的，没有过期，没有污染，现在排除试剂方面的问题，还有别的影响因素吗？

会不会现在温度太低,或者加的过硫酸铵不够,自己去排除了

你好!最近又遇到一个问题,我过柱子用的甲酸铵和乙酸铵缓冲液,不知道最后怎么除去?? 是不是冷冻干燥或者是旋转蒸发就可以了?

冷冻干燥或者是旋转蒸发就可以了,但是后者需要样品能耐受,此外浓度如果过高,冷冻干燥也不一定太彻底

我在分离真菌来源的胞外淀粉酶系,在活性染色的 PAGE 上显示距离较大的三条带,但是我用了 TOYO 公司的 HW-50,HW-55,都只有一个很大的馒头峰,酶活显示也在这一个大峰里,完全没有分开,后来又试了 DEAE,SUPER-Q,CM 在电泳图上最小的那个酶可以在 0.2M 盐浓下解吸附并洗脱下来,但之前的两个分子量较大的酶则不能分开,条件如何变换都始终在 0M 盐浓时洗脱下来,我还试了法码西亚的 MONO-Q 结果也一样,据报道淀粉酶的结构比较对称,而且用疏水色谱分离的报道很少,所以我想试试疏水的,又怕做不出来,填料白买。

三个带都有活性吗,也许你可以试试淀粉亲和填料,疏水也可以试试,纯化都是需要试的,没办法预测

本人需要检测新喋呤,用 HPLC,样品预处理中需要去离子与去蛋白。1.去离子柱文献报道用 Nick spin column, sephadex G50,听别人推荐用 sephadex G25 的预装柱 Hitrap Desalting 说是直接使用比较方便,请教大侠看看用啥合适? 2.文献报道 hplc 上机前需要用 Ultrafree-1mc PL10 去蛋白,而购买过程不知道这个 PL10 的滤膜是使用哪种型号的。(一是装有微孔 DURAPOREPVDF 膜的有 0.1 0.22 .0.45 各种规格的,一种是装有微孔亲水性 PTFE 膜的有 0.2 0.45 规格。)

去蛋白过 sephadex G25 的柱子即可,不一定非要预装柱子,自己装点填料即可,也有预装好的.滤膜不是你理解的 0.1 0.22 .0.45 ,是超滤用的膜,你可以买超滤离心管去蛋白,得液体即可

离子交换层析洗脱时候一般用的盐离子浓度是多大范围的?

通常 0-2M 都可能,没洗下来也许 pH 不合适,蛋白沉淀,或者浓度太低,自己去排查每个条件,每步都留样,好知道蛋白丢在哪步

chromatography 您好,我在做一个融合蛋白的亲亲和层析纯化,包涵体用 6M 尿素溶解之后直

接过柱子，收集的纯化液电泳检测浓度还行，合并之后进行透析除尿复性，之后再用 PEG 浓缩至体积小于 1ml，但之后跑电泳看，几乎看不到目的蛋白，在透析及浓缩的时候总有一些沉淀，但不太多，请问这是怎么回事啊？用什么办法可以解决呢？我在这个问题上已经纠缠了快半年了，急着毕业，谢谢啦！

沉淀应该就是你的蛋白,说明没复性好,复性没这么简单只透析就可以,多看看相关的文献吧.既然带标签,那你可以做柱上复性,也许效果更好点

我们最近在纯化毕赤酵母分泌的目的蛋白时，遇到一个问题一直无法解决，我想请教一下 chromatography 兄有没有好的解决方法。问题是用了许多方法例如疏水/离子等各种方法蛋白与色素一直无法完全分开（由于从生产的角度考虑，我们暂不考虑用凝胶过滤的方法），我们怀疑蛋白与色素结合在一起了，不知道是否有其他方法能够破坏蛋白和色素之间的作用力。

色素是很复杂的,你可以查相关的书,有专门论述如<酶制剂工业>上册的 196 页,你可以用活性炭,脱色树脂,亚硫酸盐等,如果是和蛋白结合,通常的作用力有静电引力,疏水和离子作用等,电荷作用力可以加盐,疏水可以加表面活性剂

我有用乙醇抽提出的多肽样天然产物若干，发现水溶性特别好，在甲醇中的溶解性也特别好，但是在丙酮中几乎不溶解，请问正相硅胶和反相硅胶哪种更适合我的进一步分离呢？有没有相关的比较好的填料供我选择呢？

小分子的我不是特别熟悉,按你的物质特性,我想应该亲水性更强,所以选择反相硅胶会好点.不知道你是做分析还是制备,最简单是选择 HPLC 分析和制备

chromatography 老师好，我用 pET-32c 载体融合表达了我的目的蛋白，诱导表达量很大，超声裂解蛋白是可溶的，用 NI-NTA 树脂纯化，但是洗脱液中杂蛋白较多，漂洗液中也有目的蛋白；后来我又在裂解液中加了 1%triton+1%tween+10%甘油+0.05%ME,也提高了盐离子浓度，然后又超声裂解，但是 15%SDS-PAGE 整块胶在溴酚蓝稍靠上的位置都有一片蛋白条带，我不知为何物？我的融和蛋白分子量约为 18KD 左右，在此条带上方，请问不只是一什么原因导致的？我怎么样才能最大限度的减少杂蛋白？还有一点就是这个树脂每次用完都需要再生吗？我看见颜色还是浅蓝色，没有太大变化，每次结合时都需要 4 度摇一个小时再装柱吗？还是直接过柱就行？由于我们实验室是第一次用这个纯化柱，有很多不熟悉的方需要请教您，希望 chromatography 老师多给加以指点，多交流一些经验，谢谢了

杂带多的原因是有的说明书写的简单,你需要用不同浓度的咪唑做阶段洗脱,按简单的方法很难得到好的效果.裂解液中加了 1%triton+1%tween+10%甘油+0.05%ME 最好别加甘油,这样黏度大,不容易扩散,影响分离,如果你的柱子载量下降明显,最好再生,可以按说明书做即可,也可以参考别的公司的说明书,www.wsac.cn 资料下载下有说明书.通常同类的填料说明书是可以互相借鉴的

chromatography: 我现在用 Sephadex G-75 纯化我的植物植物蛋白粗提物(目的蛋白 150KD)，我的计划是收集外水部分的峰，走了一次柱子外水部分的峰型很好单峰，对称，峰尖也很高。但是电泳检测发现 60KD-30KD 的蛋白也有一起在外水部分出来（峰尖的样品）。我的粗提

物在 80KD 以上就有两条蛋白带的所以我想 80-30KD 的蛋白走内水部分 和 150KD 左右的两个蛋白（走外水部分的）正好能分开。您能帮助分析一下么？我的想法是否可行，还有我的样品中含多糖和色素比较多，而且是经过硫酸铵沉淀后的，我要保持目的蛋白的活性就没有用醇沉。走柱子的上样量也在范围内 2%的柱体积。希望您给点建议，有没有什么试剂能降低我的溶液的粘度，降低多糖和 蛋白之间的相互作用的？

设想是很好，但是还和蛋白本身的形状有很大关系，你可以选择 Sephadex G-100 试试,如果还分不开,那说明这样不行,你可以用离子交换等别的方法配合,如果样品过黏那也会影响分离效果的,只能降低点浓度,没别的办法

我做的是半分析半制备型的，既需要得到一定量的样品，又得把样品分离开。有什么好的建议呢

HPLC 都能做

感觉对纯化还是迷糊的很，所以在此向您请教：我有两对 等电点和分子量 差别都很明显的蛋白，该怎么把它们分开？ 1: a 蛋白分子量：4.3K PI= 8.1, b 蛋白分子量：18K PI=5.2 (b 是不要的) 2: c 蛋白分子量：9.55K PI=9.437, b 蛋白分子量：18K PI=5.2 (b 是不要的)。这两个体系的蛋白是 Ni 柱纯化过的，然后用肠激酶切开的成为两个蛋白，其中 b 蛋白有 His-tag，纯化之后想用 a 和 c 做抗体，我现在手上的蛋白量很少，感觉是不是走柱子太浪费样品了，想请教下还还有什么办法分离两个蛋白？

1.中性条件下过阴柱,理论上要的东西穿透,不要的被柱子吸附.2 也可以用同样的方法试试.其实当时你最好是在柱子上切,这样可以避免这样分离的麻烦

chromatography 老师:我还有问题啊，在走柱子之前我用 1% (v/v) 的丙酮上样 1%柱体积的，用来测柱效，用公式： $N=5.54*Ve/W$  得到我的理论塔板数是 2400。我也没有查到这个理论塔板数在多少以上才可以用。我是 G-75 自己装柱的。丙酮样品不到一个柱体积就走出来了。您看看这个柱效能用么？还有有什么书可否推荐我几本

很难猜测,我不是特别喜欢凝胶柱子,除非没办法.我觉得最好的方法是用蛋白来分离试试,书在帖子里已经有列出,你查查就在前面

我想请教一个问题,我最近在做一个细菌胞外蛋白酶的纯化,我怀疑它是明胶酶,所以在过了 DEAE-Sepharose 后,我上了明胶亲和柱,填料是 Amersham 的 Gelatin Sepharose,按照说明书进行上样,结合,洗脱,但是我的样品总是结合不上去,在上样后用 Tris-Hcl 吸附的过程中就洗脱出来了,我想问问为什么会这样?样品是不是需要处理,或者填料是不是要活化?

也许不一定是明胶酶呢,你可以用不同 pH 试试,此外样品中的盐浓度会不会有影响,如果这些都不行,那这填料就不适合你的样品

楼主你好，我现在急需帮助，我是新手，在做到蛋白纯化时不知道要定购什么试剂，我表达的蛋白是 G S T 标签的，对于操作步骤也不怎么清楚，望给予答复

只需要填料和还原谷胱甘肽，最好是预装柱子，已经发份材料给你

楼主，你好！我想纯化一个原核表达的蛋白，21kDa，下一步做单克隆抗体，本人之前没做过蛋白纯化，用什么方法既简单又能纯化出高纯度的蛋白。老板想自己做。请您帮忙推荐一种方法！老板想用纯化包涵体的方法纯化，纯度不高。

通常是需要过柱子的，我不知道还有什么更简单的方法

小弟最近刚开始做纯化，以前一直是搞上游的，所以不知如何下手，遇到问题也没有人指导。我遇到的问题是这样的：首先，我用毕赤酵母胞外表达了一种木聚糖酶。从 PAGE 上看（考染），目的带很明显。但是在很大的地方有杂带，我就想用凝胶过滤把它除掉，只留目的带。然后，我买了 25 克 GE 的 Sephadex G-50。按照网上的说明，称了 10 克后，在 PH7.8 的缓冲液中先在 20 度溶胀了 3 个小时，接着在 90 度溶胀了一个小时。洗过几遍后，装了一个 30cm 的柱子。等凝胶完全层集下后，发现这时每分钟只能滴 2 滴缓冲液下来。换成流速就是每分钟 50 微升。我想正常的柱子肯定不是这样。当然我可以肯定没有犯低级错误，比如说有什么东西堵了或怎么样。就怀疑是不是凝胶没处理好，导致结构被破坏了。

也许你的填料过细，不知道你选的是什么颗粒的，通常选择中等大小的即可，不能选择细的或者超细的，如果不是着问题我想也许就是柱子太细，当然也有可能堵，Sephadex G-系列的除 25 外都不会快的，没办法，因为这填料就这样的

请教 chromatography 兄：我在做一个 4kd 左右的多肽，其 PI 8.1 左右，首先是 E.Coli 融合表达，带有 his-tag，后用 EK 酶切分离得目的产物。融合蛋白（21kd）经超声破菌后是可溶的（使用 Ni 柱层析的 buffer 重悬），直接上 Ni 柱（缓冲液如下），洗脱后经超滤浓缩脱盐后，电泳检测发现除融合蛋白外，还有许多的微量杂带（几乎涵盖整个泳道），请问为什么会这样？有什么好的方法解决？另外，在超滤浓缩脱盐时，最初浓缩效果较好，但是加入水稀释脱盐时，会产生絮状凝集，电泳检测其主要融合蛋白，因为这一步是为了下面的酶切做准备，请问有什么好的方法解决吗？Ni 柱层析 buffer：平衡 buffer：20mM 磷酸钠+500mM NaCl +150M 咪唑（PH7.4），洗脱 buffer：20mM 磷酸钠+500mM NaCl +300M 咪唑（PH7.4）

杂带很多就很难理解，特别是你说的这样，我觉得你的样品本身最好能过滤，此外浓度别太到，平衡液的盐可提高 1-2M，洗杂带的时候可以多洗几个柱子体积，同时多做几个咪唑浓度做阶段洗脱也许效果会好点，浓缩的问题我觉得你最好用缓冲液稀释而不用水，这样也许更好点。

向楼主请教一个问题，我们使用树脂分离纯化蛋白时，需要大量的洗液冲去杂蛋白，如何提高洗杂蛋白的效率，节省用水量同时也是减少向环境排放大量盐类物质？这里没有过柱子，直接在搅拌条件下洗去杂蛋白。

你可以调 pH 和缓冲液浓度，这样洗脱能力会加强的，或者你摸好了条件可以以洗杂带的缓冲液为平衡液，蛋白样品也调的一样，这样就可以避免洗杂带的问题，此外过柱子会洗的效果更好，如不是过柱子，那就只能少量多次

谢楼主的指教。我用的树脂是中号的，现在我想了一下，我在装树脂的时候先把柱子中加满了缓冲液，然后在上面安上了一个漏斗，之间用海绵紧密的塞着，让凝胶 在里面自然沉降，我想这

样是不是使凝胶承受了很大压力,致使凝胶之间压的太紧了因为漏斗和柱子之间是紧密连接的,上面的液体下流很慢

和你装柱子等关系不大,也许你的柱子不好,有的柱子底没设计好,所以很容易堵,或者筛网不合适,此外不能流速太快,压力大也容易堵,自己去排除一下吧.此外这填料本身就是慢,如果都没问题,那你也只能将就用,要不就换好填料

我做的是蛋白水解成肽的课题,想问一下,水解出的肽分子量在 1000 以下的用多大的柱子,非常感谢!

不明白,你是指填料分离范围还是柱子的大小,请说清楚点.如果是说柱子多大,关键看你要处理多少量或者多少体积的样品,如果是填料的分离范围,那要看你的物质分子量分布在什么范围才好选,总之最好查文献,否则没确定的方案

请教 chromatography 兄: 我现在纯化一个抗原, 经过了一根 Q 柱和一根 NI 柱后, 还有两条带。进一步纯化遇到了点问题。蛋白分子量在 50kd, 等电点是 5.8。考虑进一步用 source 30 纯化, 但将 pH 从 8.0 调到 3.0 时蛋白沉淀了, 不知道有什么方法可以避免? 还有已经沉淀的蛋白能不能复溶? 俯上的图是 NI 柱的结果, 第 2 道是 Q 柱的洗脱作为 NI 柱的上样, 第 6.7.8 lane 分别是 20%、30%、40%B 洗脱 (b 液是 0.5M 的咪唑), 40%B 仍有少量杂带, 现在想将 30%B 洗脱中的下面那条杂带去掉。谢谢。另外, 现在有一个 600KD 的白蛋白需要纯化, 样品是人血, 不知道用什么方法比较好?

1.沉淀的样品很难再溶解,当时沉淀你可以马上调 pH 到中性, 如果不能溶解呢没办法, 也许只能用盐酸胍或尿素去溶解, 你可以用 source 30Q 试试能不能好点,我觉得你的镍柱子摸索有点粗,你最好做 10%的 B,然后再开始剩余的,没个浓度最好做 5-10 个柱体积,此外你可以直接上镍柱,同时还需要留意样品最好制备好马上纯化,优化的例子很多,这里不再罗嗦.3,白蛋白纯化的方法也不少,查文献就知道了,通常可以用染料亲和或者金属螯和铜离子等方法去纯化

请教楼主,我做有 HIS 标签的蛋白的纯化,用 Ni 柱可以把,那个公司的比较好,推荐下,过柱脱盐后是不是应该跑 SDS-PAGE,把胶切下来研碎再浓缩蛋白,我最后是要打兔子只抗体

可以,选择填料的公司很多,但是要选择有售后服务的,过柱子后直接脱盐去免疫即可,并不需要切胶,除非柱子分不开才这样

小弟刚开始做纯化,遇到了一些问题,还请大哥指点一下。重组蛋白有 His-tag,裂解后 (25mM/LTris-Base, 300mM/L 氯化钠, pH8.0) 过镍柱 (挂的不好,流通液里占了大部分),但还是能得到一部分目的蛋白 (纯度的话,目的蛋白约占总蛋白量的 80%-90%),浓缩至 2-3 mg/ml 过 GE 的 ResourceQ 时 (上了 500 微升),只有几个小峰(光吸收只有几十),没有主峰。取峰,峰间的溶液电泳,发现都有目的蛋白。这是不是说明我的目的蛋白均一性不好,没有挂上柱子,还是有其他的什么原因呢?

流穿一部分是很正常的,这不算挂不好,纯度的问题最好去优化纯化的条件,可能的话别过别

的柱子,离子柱上经常会出现峰不同而样品有时候相同,不是因为蛋白不均一,是由于分离条件和离子柱本身的原因,不过就你实验,浓缩后的样品要不除盐是挂不上的,所以多留意你的样品和分离条件

再次感谢色谱兄的指导,在此还有一个问题,样品中的盐会不会出峰,盐这种小分子应该不会有吸光值吧,还有就是缓冲液中的盐会不会进入凝胶中而滞后的洗脱出来

盐不会有吸收的,凝胶中而滞后不滞后得看是什么填料,如果蛋白和盐都走内水体积,估计也滞后不了多少

我在做层析柱纯化蛋白时想先跑一下 sds-page, 但我在 page 中, 分离胶的制备中, 分离胶的下层跟蚯蚓爬过似的, 而上面则是平的, 想问一下这是什么原因?

如果不影响你的实验,我觉得无所谓,会不会是因为浓度不均匀造成的

1.这样子的分子量差距用超滤管可以实现分离吗? 如果可以的话,一个样品买一个超滤管行吗? 会不会由于滤的太多而使截留在上层的分子量越来越小呢? 2.我打算这次不进行酶切,这次纯化的拿去做药理,这样的分子量差距,那个 His-tag 不会对药理实验结果有什么影响吧? 3.下次再做就按您说的柱上切的方法做纯化,这个是不是要根据以前的经验,看蛋白在什么咪唑浓度时洗脱。要在这之前换肠激酶缓冲液(这个缓冲液不会把样品洗下来吧)然后酶切(酶切要不要把整个体系挪到 23 度烘箱里面去啊? 我看有篇文献在 4 度冷库切的)酶切以后剩下柱上的蛋白就不要了,这个过程对吗? 4.我最近对包涵体纯化透析时形成沉淀也很头疼,我用尿素溶解包涵体,在上样前可不可以对它进行稀释,免得洗脱缓冲液都要加尿素,这样做会不会使样品在柱上形成沉淀洗脱不下来呢?

1.超滤比较难选,而且有时候也有损失,当然你可以问卖设备的厂家,如果你一定要用分子大小分离,建议用凝胶柱子比较简单,收率高点,就是处理量小。2.His-tag 通常不影响活性。3.基本是你说的那样,但是切不一定要在 4 度。4.你说的方法估计不行,除非你已经复性好了也许行。但是都危险,容易堵柱子,多看看材料吧,复性本就不是简单的事情

还要麻烦问您一下,我要分离 20kd 到 200kd 左右的蛋白,用多大浓度的凝胶好?

没什么凝胶柱子能把这样宽范围的分离好,需要配合别的分离手段,除非你是用 HPLC 的凝胶柱

小弟刚开始做纯化,遇到了一些问题,还请大哥指点一下。重组蛋白有 His-tag,裂解后(25mM/L Tris-Base, 300mM/L 氯化钠, pH8.0)过镍柱(挂的不好,流通液里占了大部分),但还是能得到一部分目的蛋白(纯度的话,目的蛋白约占总蛋白量的 80%-90%),浓缩至 2-3 mg/ml 过 GE 的 ResourceQ 时(上了 500 微升),只有几个小峰(光吸收只有几十),没有主峰。取峰,峰间的溶液电泳,发现都有目的蛋白。这是不是说明我的目的蛋白均一性不好,没有挂上柱子,还是有其他的什么原因呢? 流穿一部分是很正常的,这不算挂不好,纯度的问题最好去优化纯化的条件,可能的话别过别的柱子,离子柱上经常会出现峰不同而样品有时候相同,不是因为蛋白不均一,是由于分离条件和离子柱本身的原因,不过就你实验,浓缩后的样品要不除盐是挂不上的,所以多留意你的样品和分离条件。多谢指点! 过 resourceQ 之

前浓缩的时候已经用无盐的缓冲液置换过了，上离子柱时氯化钠大概是 30mM/L 左右吧！优化纯化的条件是指筛选洗脱的条件吗，能否具体说一下，小弟刚开始做

如果不是盐影响，那你就看看 p H 是不是合适。镍柱子的优化可以选择不同浓度的咪唑做阶段洗脱，你可以参考 [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载下镍琼脂糖凝胶说明书去做

再次请教 chromatography: 我用镍琼脂糖凝胶 FF 柱所配的缓冲液 1 和缓冲液 2 (含咪唑) 需要高压吗？能高压吗？还是用滤膜过滤呢？需要多大孔径的滤膜？

不需要高压,过滤可以用 0.22 微米或者 0.45 的即可

请教 chromatography 兄一个关于填料的问题，一般市场上卖的金属螯合填料，是买来的时候就已经把金属螯合好了呢，还是买来以后要使用者自己螯合的呢，因为自己做了这种类型的填料，最近老板要卖给别人，所以比较急，先行感谢

通常是已经螯合好的,但是只有 GE 的有一种没螯合金属离子,螯合好的一般用 100-200mMEDTA 溶液洗掉然后换成你需要的金属离子即可.通常的产品自己要说的话也许不需要考虑很多问题,但是要是做产品买需要质控和测试等

螯合镍的填料是我自己合成的，镍的吸附量以及对蛋白的吸附效果还可以，老板现在的意思是让我参考一下市售填料的标准，做这个填料的说明书，我想请教一下，一般的说明书上有哪些内容，比如说如何解吸附镍的方法，如何螯合金属离子的方法?? 还有个不解的是，如果买来的时候就已经螯合好了金属离子，那用完一次以后，是不是要进行树脂的重生，然后进行金属离子的吸附后，才能进行二次使用呢；还是用完以后，不需要重新螯合金属离子便能重新使用呢？

那你可以参考进口的类似填料说明书即可

chromatography, 你好，我是刚开始做蛋白纯化的新手，我的实验中要使用 deae sepharose fast flow 纯化血清白蛋白，66.5kda,pi4.7,我不知道该用多少柱体积起始缓冲液平衡柱子，请多指教！

平衡需要 5-10 个柱体积,你最好是去看看实验书,一些常识的东西这里很难有篇幅写,也写不全面,所以对新手我总是觉得需要系统去读几本书,这样才好

我想纯化乳铁蛋白,它的分子质量为 80ku,等电点为 8.0,现在有 CM-toyopeal ,CM-Sephadex C50, SP Sepharose FF 三种填料,向选择载量大,刚性好,流速高的,想要工业化生产,您能给一些建议吗?

我觉得你需要先试试,我没用过 CM-toyopeal ,但是我觉得 SP Sepharose FF 也许更合适

我刚开始做蛋白纯化,文献上写的在蛋白过柱纯化以后要用 PEG20000 浓缩,我想问一下具体是怎么操作?是离心还是其它方法?

蛋白溶液放透析袋中,先用缓冲液透析,然后在袋子外撒 PEG20000 干粉,浓缩到你需要的体积.此外你也可以选择超滤离心管浓缩,那样更快点

我现在做的是天然有抑菌活性的小肽的提取,经 cDNA 序列分析,蛋白应在 2K-3K 间,是一系列的蛋白,有十多种,这些蛋白的等电点一部分是 5 点多,一部分是 8 点多,也有很少部分在 11 点多(可以不要),计划使用阳离子交换,再过 G-25 凝胶,而我现在手里有 CM-A- sephadex 25,想问一下,是不是用这个胶的分离效果和阳离子交换+G-25 凝胶的效果差不多,还想请 chromatography 老师指点一下,用 CM-A- sephadex 25,我的平衡和洗脱的条件(PH 值和离子浓度)应如何设置?这么小的肽跑电泳可以跑出来么,是不是要特别纯啊,我跑的蛋白电泳图分子量大概在 6K,是不是经 cDNA 序列分析的分子量和电泳的分子量会有差异啊?

CM-A- sephadex 25 不会有你想要的效果和阳离子交换+G-25 凝胶的效果差不多,因为凝胶作用由于电荷作用力是很难清楚的,你最好看文献,按你的东西也许 HPLC 是最好的方法,别的都难得到好的分离效果,具体的操作你也按文献去做,对于不具体的实验,我也没什么方案,需要自己多下工夫.电泳对太小分子的怕是很不准确的,所以最好能有标准品做对照

刚开始用疏水层析柱,请教个问题。我的蛋白,75kD, pI 5.2。在 ecoli 表达很低, <500ug/L。先用 His-tag 纯化, TALON 柱, 30mM 咪唑能洗脱,有许多小的杂蛋白;再用 ResourceQ 和 Superdex75, 效果不好。好像目的蛋白比较粘(或者是电性,或者是疏水作用),很容易非特异吸附其它蛋白。先用硫酸铵沉淀,再 His-tag 纯化,杂蛋白少了许多。现在想用疏水层析。我的蛋白在 30% 饱和硫酸铵 (~1.2M) 下,就沉淀。是不是意味着这个蛋白的疏水性很强?(用软件做分析,疏水性不强)。

TALON 柱应该是粉红色的是吗,如果是的话它用的是钴离子,这填料对 His-tag 纯化并不很常用,原因就在于作用力太弱,有的蛋白可能挂不上,你可以选择普通的镍琼脂糖凝胶试试,同时你洗脱条件最好是能优化,用 5,10,20,30mM 咪唑做阶段洗脱,这样也许效果更好,此外可以先沉淀再上亲和柱子,总之亲和是首选,同时优化条件,不得已才选择别的方法,沉淀和疏水并无太直接关系,当然你也可以疏水,总之优化条件很重要,总比多过柱子强

请教色谱兄,我现在使用 Amersham 的 Phenyl Sepharose CL-4B 分离一种蛋白,该蛋白在 C18 反向 HPLC 上有明显的保留时间,疏水性跟胰岛素类似。请问这种填料吸附量是多少 mg/mL? 由于有较强疏水性,该蛋白不易洗脱,怎样才能让其合理洗脱呢?

C18 反向对很多疏水性不强的也会吸附,关键看流动相,而且载量也很平衡的缓冲液条件关系很大,现在不很知道你东西是不是能吸附,何况是载量呢,你先做试试有问题再讨论,否则没做就讨论是没意义的.如果洗脱不下来,可以增加洗脱液的洗脱能力,如加表面活性剂,乙醇,乙二醇,甘油,异丙醇等

我用的 Sephacryl s-200 的柱料不小心洒到了地上,问一下有没有可能再次回收利用,如果可能怎么用才可以? 谢了

没什么太好的方法,你可以把填料和水混合,把底下脏的和上面的都去掉,反复几次,如果杂质不多那应该还好,如果太脏那也没什么办法,只能用新的,或者你装柱子试试

您好！我想请教一个问题。我刚开始做单抗，现在已经收集到腹水了。接下来我需要分离纯化出我的单抗，然后送出去用酶标记。我该怎么纯化呢？

如果你的抗体是 IgG,那直接选择重组蛋白 A 琼脂糖凝胶做亲和纯化即可.很多地方都有这产品

chromatography 老师：我用 DEAE—FF 作离子交换。样品是用 PEG 沉淀后的蛋白，平衡液是 50mM 的 Tris-HCl、0.1M 的 NH<sub>4</sub>Cl，pH=7.5。用 50mM 的 Tris-HCl、0.1M 的 NH<sub>4</sub>Cl，pH=7.5 将沉淀溶了，然后手工上样.然后梯度洗脱，用（0.1-0.35M）NH<sub>4</sub>Cl 的梯度，可是，样品一上去，很快就都洗下来了。只有一个峰出现。请问，我该如何调整条件？

0.1-0.35M)NH<sub>4</sub>Cl 的 pH 也是 7.5 的话,那你开始的可以将 50mM 的 Tris-HCl、0.1M 的 NH<sub>4</sub>Cl，pH=7.5 溶液中的 NH<sub>4</sub>Cl 去掉,同时从这开始建梯度,延长梯度的时间,也就是梯度缓一些,这样也许好点,此外样品太少也会是一些洗脱不分不成峰,总之自己多去了解一下色 谱的理论,多做优化和尝试

chromatography 兄：你好！想请教一下如何对有 His 标签的带有肠激酶位点的融合蛋白进行柱上酶切，应该注意些什么？

其实很简单,蛋白吸附,洗去杂带后,直接用酶切缓冲液平衡 3-5 个柱体积,然后把一定浓度的 2 倍柱体积的酶液过柱子,温度和时间根据一般酶切的条件,然后 再用酶切缓冲液冲洗,收集有蛋白的部分,剩余在柱子上的可以用咪唑洗掉就可以,另外的方法可以把吸附蛋白的填料取出和酶切溶液混合,然后离心或过滤得酶切 部分,剩余的用咪唑洗脱即可,具体的条件自己去设计.也可以参考 GST 融合蛋白柱上酶切的方法

我的样品中主要有两种蛋白，12kd 和 30kd 的，我用过自己装的 sephadexG50 ， G75 和 sephacryl S100，都是一米长，内径 1.6 厘米的，可是怎么都分不开，两个蛋白总是一起出来，这是怎么回事呢？我想试试 sephadexG100 可以吗？

G75 和 sephacryl S100 都不行,sephadexG100 更不用试,不或你可以尽量少上点样品再试试,如果还没结果那你最好还是换别的方法如离子交换或疏水等

chromatography 兄：现在用 sepharose 4B 琼脂糖耦联抗体纯化黄病毒非结构蛋白蛋白 1，发现在碱性条件下不能将蛋白洗脱下来（40mM Diethylamine，TNE 洗脱缓冲液，pH11.4），只能够在酸性条件下洗脱，我要的蛋白是二聚体，其在酸性条件下解离成单体，现在该怎么办

你可以酸性条件下洗后中和到碱性不知道能不能又聚合了,如果不能我真不知道还能有什么洗脱的方法.通常碱性是难洗下来的,何况碱性过强对你的抗体活性也有影响

(1)如果在纯度和浓度保证后,免疫亲和纯化对用于耦联的抗原都有什么要求?我们的抗原是重组的,大概 160 个 AA,亲和部位主要在 70 个 AA 以后的位置。(2)上柱前,血清都需要做哪些处理?可以过滤后直接上样?还是需要需要做硫酸铵沉淀后上样?如果先过 Protein A 再过耦

联的抗原亲和柱是不是显得多此一举？

对于蛋白类的样品,我觉得选择 NHS 活化琼脂糖凝胶是不错的选择,因为偶联条件温和,pH6-9 都可以,时间短 3-10 小时即可,而且有 9 个碳原子手臂.[www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载下有说明书可参考。1.抗原纯度越高越好,浓度最好 3-10mg/ml.2 血清不需要特别处理,但是黏度大需要上柱缓冲液稀释,不需要硫酸铵沉淀,也没必要过 Protein A,是多此一举,而且会使抗体的收率和活性都降低

新手上路: 请教凝胶过滤层析的具体操作步骤,配胶、灌柱子、上样、样品洗脱时的具体操作及相关注意事项(用的是 sephadex G—50)。

可参考生化实验书中有关凝胶柱的实验。

chromatography: 我想请问一下,我用 Ni-NTA 纯化目的蛋白,用 0.3M NaCl, 0.05M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.25 M 咪唑, pH8.0 缓冲液洗脱蛋白。由于蛋白纯度不高,考虑使用离子交换再纯化一次。分别用 0.02M, pH 5.8, 6.5 7.8 的磷酸缓冲液和 0.05M, pH 5.2 醋酸缓冲液置换样品缓冲液,结果都有目的蛋白和其他蛋白析出,请问这中情况可能是哪些原因引起的? 我需要注意哪些条件,避免目的蛋白在缓冲液置换过程中析出?

我觉得你最好还是优化镍柱的条件为好,大多说明书都写的过于简单,对自己的蛋白还是需要不同浓度的咪唑做阶段洗脱.离子柱子怕是浪费时间,出现这样的原因是因为 pH 洗脱很难彻底,同时离子柱子也非单一作用力,所以比较复杂,你可以选择盐洗试试

chromatography 兄: 最近用 CM-Sepharose FF 纯化一个毕赤酵母分泌表达的酶,首先做了个 75%的硫酸铵沉淀,然后透析,透析之后,我首先用试管小样试,做了 PH6, 6.5, 7, 7.8 的梯度,该蛋白理论 PI 是 8.34,每个试管加了 1 毫升的树脂,往里面加了 100 微升的酶液,放置一个晚上之后,取了 100 微升测酶活,发现跟阳性对照完全一样(阳性对照是没有加树脂的酶液),也就是说蛋白完全没有挂上去。在此想问一下,为什么会完全挂不上去,是不是透析没有透析好,有没有什么办法可以看出盐被除掉了。有没有什么办法可以代替硫酸铵沉淀。透析的效果究竟取决于什么。

你可以把 pH 降低到 5 左右试试,当然我也怀疑透析不干净,其实检测是很简单的,在透析后取出点样品然后滴一滴氯化钡溶液,如有白色沉淀说明没透析干净,同样的道理,如果是透析的盐为 NaCl,就用硝酸银溶液检测即可。如果透析没问题,那还有就是你样品和填料混合的时候是需要调 pH 到和填料一致的,否则就可能挂不上

chromatography: 您辛苦了,想请教一下,我用 CM-C50 的离子胶,说明书上写的是分 30K-200K 的蛋白,而我的蛋白只有 3K 左右,蛋白等电点在 8 以上,但我只想用它的离子效应,用 0.02mol/L 的醋酸铵平衡,PH=4.6,用的是自己烧的三蒸水配制,平衡时就把蛋白都洗下来了,蛋白总挂不上,(用 1mol/L 的醋酸铵洗脱)不知为什么? 是因水的问题么? 还是这个型号根本就挂不住小蛋白?

3K 左右也没问题,只是这个填料很老,压力和盐改变都会导致填料体积发生变化,挂不上我也不是很清楚,你可以把缓冲液浓度降低到 5mM 试试,此外你样品的 pH 和盐浓度要和平衡柱子

的一致.如果不行,那你就换阴柱试试

请问 Size Exclusion Chromatography 什么东西,在哪能买到?我想分离混合蛋白中的的 250kD 和 60kD 的蛋白。

Size Exclusion Chromatography 就尺寸排阻色谱,也就是凝胶过滤色谱,你看文献选择的是什么柱子或填料即可,它是很大的一类,你不说具体型号是选择不了的.何况也不知道你要做的是分析或制备.你还是看看文献再说

文献上选择的是 size exclusion chromatography with Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) FPLC size exclusion 。具体的原理和使用方面技术请色谱兄简单的指点一下。我目前是做分析用。

Superdex 200 HR 10/30 其实并不是分析柱子,何况你要用的话那还得有设备,所以要是你没条件,建议直接用 HPLC 柱子,你可以查文献,抱歉,常识的东西你需要自己去看书.<生物工程下游技术>中有

首先非常感谢 chromatography 兄的指导,我用氯化钡检测,没有看到白色沉淀,说明透析做的还可以。然后用 PH5 的醋酸试了一下,发现蛋白可以结合到树脂上。但是我 是用试管小样法做的,没有上过柱子。现在想问一下,上柱子后要用多少的起始缓冲液去平衡,还有平衡好后,上样之后,要让蛋白结合多长时间

最好看看实验书,平衡需要平衡到 p H 和你的平衡缓冲液一致就可上样,上样流速控制慢点,你的填料流速也快不了,不需要等待就可以结合,自己多看看书吧。常规的操作书上都有

chromatography 兄:你好!我们实验室的一个瓶子包装出问题了 搞不清楚里面装的到底是 G15,还是 G150 了?? 能不能想办法

很简单,称取 1 克干胶,加水,如果溶胀后填料体积小于 5 毫升的,那就是 G15,如果体积 10 毫升左右,那是 G150

我想问下我 whatman 的 DE52 的柱子应该怎样处理哪?看有些帖子上说用酸碱处理,但说法不一,我找了半天您这个帖子的答复内容也没找到相关的,如果您已经回答过这个问题,能不能告诉我具体的帖子地址或再告诉我一次哪?

理论上是需要酸碱处理的,但是我觉得新的填料溶胀装柱直接平衡就可以用了,不需要特别处理

那就是用蒸馏水溶胀后在在位平衡就可以了是吗?一般溶胀需要多长时间,温度控制在多少合适哪?我第一次做,不大懂得,谢谢了!

是的,溶胀水泡过夜就可以,常温.这填料太老,现在很少用,大多都用 DEAE 琼脂糖凝胶代替

请问,我想分离一个小肽,能否给些建议?用 sephadex g-10,这个要自己买回来自己装柱子吗,

柱子要什么样的呀?

关键看分子量,不过凝胶柱子未必能分的很好,可以用 HPLC,当然也可以配合离子交换去做,新手请多看实验书和文献,常规的东西我很难一一回答,你可看看生化实验书。你需要自己装柱子,需要 60-100cm 长的柱子

请问 chromatography 老师, 我用 BBST NTA Resin 说明书上的再生方法对 HisPrep FF 16/10 再生发现柱子似乎花(有些部分蓝有些部分带白色)特别是柱上半部分明显些,我这样操作是不是不对? 还有二者的基质是不是琼脂糖凝胶?

估计柱子上面白色的部分是镍离子掉了,最好重新螯合镍离子.我没用过这公司的填料,我觉得不应该这样

HisPrep FF 16/10 是我们实验室买 AKTA Purifier 时一起买的, 它应该是 GE 医疗集团的, 我在网上没有找到它的说明书, 所以不知道怎样再生, 请问您知道吗? 你是说没用过申能博彩的 BBST NTA Resin 吗? 重新螯合镍离子应该怎样操作?

对,是没用过 BBST NTA Resin 的,你买的 G E 的产品应该有说明书的, 可以参考别的公司的说明书. 如: [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载下镍琼脂糖凝胶说明书是中文的,也很详细.或者直接按 Ni-Sepharose 说明书做

chromatography 兄:

你好! 想请教一下如何对有 His 标签的重组蛋白纯化的问题, 我是原核表达的, 重组的蛋白有 40KD 左右, 占总蛋白表达的百分之十几, 包涵体形式, 打算是纯化后作多抗, 准备买 NI 柱, 10ML 填料应该够把, 2000 块钱以内, 老板打算买阿码西亚的(好像被 GE 收购?), 因为老板也不大懂, 我更不懂, 希望 chromatography 兄推荐一下具体型号的产品, 最好有产品代码, 公司, 价格啊. 越详细的资料越好啊, 急着过年前纯化完, 买预装柱, 多谢啊

GE 好象没 10 毫升的预装柱,倒是有 5 毫升的,我用的都是自己的产品的,不好推荐有做广告嫌疑, 很久没用他们填料了,其实很多公司都卖他们的产品,你可以问问别的公司或者直接去他们的网站.如果你用有什么问题再讨论

我是个蛋白纯化的新手,能否介绍基本关于填料的专业书给我们?

<生物工程下游技术<蛋白质纯化实验指南>等,还可以参考各家公司的说明书和填料选择指南及相关材料

想问一下楼主, 做蚕丝线的纯化中遇到在 80kd 有两个蛋白非常近, MS 的结果也证明同源性在 80% 以上, 2de 时也很近, 由于我们要点晶体, 要求性质均一, 所以想问问有没有什么比较好的方法可以试试. 用过 Q XL, Phenyl ff highsub, superdex 200 在这个位置区分效果都不好

如果你只是分析和少量制备,那也许需要 HPLC 或者 5-10 微米的高分辨率的离子交换填料

我的是可溶性的蛋白，表达量也不错，纯度也非常好，不知道为什么在超滤浓缩除盐这一步出现这样的问题，蛋白很大一部分变成了白色沉淀！很心疼呀。我用的是 PBS 缓冲液，望老师指点

你留意改变 pH 等因素看看,也许蛋白浓度太高溶解不了,或者 pH 不合适

chromatography 老师，我是纯化新手，请教一下，我的酶做硫酸铵沉淀，活性很分散，最主要的是离心后，总有一层不溶物浮在最上层，可能是脂类吧，但这层也有我的酶，所以做硫酸铵沉淀结果不是很理想，我也试过 DEAE，结果还是不理想，收集不到有活性的酶，而且粗酶过柱后很容易堵塞柱子，几个月下来没有一点可用的结果，令人很沮丧，还请 chromatography 老师指点一下我该怎么做？有没有什么办法除去脂类影响？

如果这样,你的样品在提取前需要先脱脂,浓度过低的样品不适合用硫酸铵沉淀,此外有损失也是正常的,如果过柱子就堵,说明你样品溶解不好.我想你还是需要再在样品处理上多花点工夫,然后再过柱子

chromatography 老师，有什么方法脱脂？我用纱布过滤后还是一样沉淀不下来，您有什么更好的办法？

那需要看你的材料是什么,你可以参考<生化制药>有关的章节,纱布眼太大,所以估计样品还是不澄清,总之自己多看看书,粗提估计就没做好

正如您所言，样品很浑浊，但那是从别人那拿过来的一种粗酶液，我没有办法从粗提开始，我试过高离心、酸化、丙酮沉淀等方法，但是对我的酶活影响都很大，快崩溃了！

所以你该和做提取的一起去解决提取的问题,否则是没办法做的.或者改变 pH 或缓冲体系尽量解决溶解的问题再往下做

chromatography 老师，你好，想请教您一个问题——我要分离的是一种载脂蛋白（28kD），而与其共存的还有其他一些载脂蛋白（8kD，46kD，6kD，34kD，75kD）我看到的文献中好多用凝胶层析分离，也有用离子交换层析分离的，就我的实际情况，应该选择哪一种层析呢？盼回复，谢谢

我觉得通常只用凝胶柱是很难得到好的结果的,所以需要配合离子交换,这样很笼统的问题建议你按文献去做,同时多看一些实验书,实验是需要做才行的,此外也可以考虑疏水色谱,我觉得这蛋白疏水性应该比较强

chromatography 兄:你好,我要过阳离子树脂,但是蛋白粘度很大,这样是不是影响上样量啊?资料上显示柱体积的 1~5%. 原来在资料上看过 但是找不到了

离子柱子上样量和载量有关,和体积没关,你说的那是凝胶柱子的上样体积,请多看看纯化的实验书和色谱材料,这些答案书上都有,如果没时间去读是很难系统了解,也很难做好的

急需分离纯化出 BSA 和耦连了 12 个分子的 BSA 耦连物,两者分子量相差 4.2K,最大的耦连

物分子量为 50KD, 请问可以用 Amersham 的 Sephacryl S100 HR 来纯化否, 若可以有什么注意事项, 比如样品浓度、柱长、上样速度和洗脱液要求等。

偶连的 BSA 和没偶连的 BSA 用这样凝胶柱子是不可能分开的, 除非选择 HPLC, 但是这样又没活性, 除非是 HPLC 凝胶柱子或者离子交换柱子, 自己查文献看看吧, 如果只是把小分子和大分子分开倒是容易, 你说的柱子 S100 HR 是分不开的, 别浪费时间和钱

很感谢您的回复, 不过我还想请教您一问题, 请您别介意! 我已经查询了 S100 HR 柱子说明书, 询问了一些人, 是可以分离的, 但在操作上要很注意, 请问您分不开的原因, 能否告知?

个人觉得 BSA 和增加 4KD 的新蛋白是很难用你说的那柱子分开的, 当然你也可以试试, 除非你偶联的不是一个 4KD 的东西, 我不熟悉, 你自己最清楚, 我说只是差 4KD 是分不开的, 你问我也说个人看法而已

很不好意思, 我把 OVA 写成了 BSA, 因 OVA 的分子量为 45KD, 一个耦连的小分子为 350D, 结合了 12 个, 所以就相差 4.2KD。我后来查了一些文献, 用 S100HR 是分离不开的, 分子量相差太小了, 我在考虑是否可以用 Superdex 75HR 和 200HR, 以及离子交换柱。请问他们是否有合适的, 谢谢!

Superdex 75HR 也只能试试, 但是我觉得还是很难分开的, HPLC 的凝胶柱子也许会好点, 200HR 范围过宽, 不如 Superdex 75HR, 可是这样一根柱子都在 2 万左右, 分不开又浪费前, 我宁可用 HPLC 去做. 或者试试离子柱

请教色谱兄, 我在纯化一个蛋白质, 它有一定的疏水性, HPLC 时在 C18 上面有一定的保留时间。我用 HIC 优化条件进行了分离, 效果甚佳, 电泳显示杂带都被除去, 纯度很高。但再去做 HPLC 时却发现主峰丢失了, 这跟电泳结果十分矛盾。于是我将标准品用同样的条件过了一下 HIC, 表现力完全一样, 电泳分子量也正确, 纯度也高, 但在 HPLC 时依然丢失主峰。太奇怪了, 这是为什么呢?

也许 HPLC 柱子吸附过强所以没出来, 你还是多改变洗脱条件试试, 或者选择 HPLC 的凝胶柱或者离子柱试试. 因为毕竟反相柱的疏水性远强于疏水色谱的填料, 大概强 10 倍多, 此外也可能你蛋白浓度过到导致沉淀, 你可以降低样品的浓度, 同时也可以洗脱和平衡液加一些降低疏水性的表面活性剂或增溶剂

chromatography :你好! 我刚买的 SEPHODEX G-25, 称了 60g, 结果溶涨后到了 400ml, 不知道是不是公司送货送错了?

对, 差不多这样. 1g 可以到溶涨到 5-6 毫升. 你可以用来除盐试试, 如果没问题应该没错

请教 chromatography 老师: 我作的是一个病毒蛋白的表达, 用 E.coli 表达系统, 表达量不大, PAGE 胶上条带非常模糊, 但是全菌杂交可以得到非常特异的条带。于是, 我做了蛋白纯化。先将诱导的全菌体进行超声波破碎, 离心得到沉淀(1)和上清(2)。沉淀(1)用包涵体洗液洗涤之后基本上就没有什么沉淀了, 但还是把沉淀上柱子作了 his 纯化, 跑胶发现什么也没有, PAGE 胶上一片空白。同时把上清(2)作 his 纯化, 倒是看到了蛋白, 但是条带和全菌

体差不多，只是稍微淡一点，完全不像是纯化后的蛋白。请问这是问什么呢？我的蛋白到底是包涵体还是可溶形式呢？

1，盐酸胍存在的情况下跑电泳是跑不出来的，需要去掉才能跑。2，纯化需要多上样品，摸好条件，不会一下就能做好的，可以问卖给你填料的公司，或者仔细阅读说明书，你的应该是包含体和可溶性表达都有

你好!我有一个 75kda 的蛋白需要纯化，我不知道凝胶该用 Sephadex G 75 Superdex75，如果用 Sephadex G 75 的买超细的还是一般的，谢谢！

当然是 Superdex75 好，只是需要好柱子，Sephadex G 75 很难用，流速太慢，超细的更慢，没办法的情况下那就买一般的，此外只过凝胶柱子不会得到很好的结果的，你需要别的如离子柱等配合

我有个问题想咨询你：我的蛋白文献报道的是用 BLUE-Sepharose 6B 纯化的，但是我买了北京韦博色谱公司的 sepharose 6B FF，纯化效果不好，请问是什么原因？

BLUE-Sepharose 6B 和 sepharose 6B FF 是完全不一样的，你买错了填料了，BLUE-sepharose 6B FF 是兰色的，而 sepharose 6B FF 白色的，你需要换填料，不是你经销商弄错了就是你定错了，所以最好直接和厂家联系

色谱老师，还想请教一个问题：我看的文献是用 6M 的尿素-tris.HCL-EDTA 作为洗脱液，不知道这种条件下，我要的载脂蛋白 AI 会不会失活啊？

那看你的蛋白，不同蛋白稳定性不同，你可以试试

色谱兄:小弟最近在做纯化,只能算是刚入门,对很多诸如柱子,填料之类的问题有的还不太明白,想问几个问题: 1.纯化一个未知蛋白,一般的步骤是什么?要做什么工作?有什么需要注意的问题? 2.能对一些常用的填料做个分析:如离子交换的介质,Q,DEAE,CM,SP 等有个比较系统的比较;疏水柱常用介质有哪些?较好用的是哪些?还有什么情况下使用疏水柱比较好?其他的还有分子筛,亲和层析等等,以及一些我不知道的没有罗列出来的也麻烦指点一二.

抱歉,这些问题都太大了,很难一一回答,自己去看相关色谱或者蛋白纯化的书才好,因为这些问题足可写几页了, [www.wsac.cn](http://www.wsac.cn) 资料下载下有生物大分子分离纯化策略中差不多能回答你的有关色谱和填料的问题.书可以参考:<蛋白纯化与实验鉴定指南>、《生物工程下游技术》、《酶工程》、《酶制剂工业》《生化实验方法和技术》,《蛋白纯化实验指南》,《生化制药学》,《药物蛋白质分离纯化技术》,《蛋白质纯化技术及应用》, 《protein purification》等

chromatography 兄，想请教你一个问题：像胸腺肽这类物质国内外都做得很多，我想问问一般这种小分子的肽类物质，分子量大约是 1000，采用的是什么分离纯化的方法？还想问问你对像 AKTAprime 这类的蛋白质纯化系统有没有了解？我查了一些文献说可以用 AKTAprime 蛋白质纯化系统，然后用 Superose 6 分离范围在 5000-5000000 进行分离，我觉得小分子肽的分离范围不在 Superose 6 分离范围 5000-5000000 之内。

如果只是小于 1000 的, Superose 6 范围太宽未必有很好的效果, 你可以现在离子交换配合 G25, 但是要想得到很纯的还需要用 HPLC, 现在多肽合成的胸腺肽都是需要用 HPLC 制备, 不怎么用常规的方法, 因为分离效果差, 而且相近的物质多

非常感谢 chromatography 兄, 我做过 G25 走出来的峰是阶梯状, 根本就分不开。也走过 G10, 能够分出来, 但是出来较好一点的峰有没有活性, 所以想问问有没有更好的方法, 我老板想让我用 AKTAprime 蛋白质纯化系统来研究, 可是我是初学者, 根本就不知道还能用什么柱料, 柱料都很贵, 又不能乱买柱料回来试, 所以很愁!

AKTAprime 蛋白质纯化系统对于 1000 左右的分子也没什么好方法, 对你的物质最好直接出钱用 HPLC 是更好的方法, 你自己多看文献, 常规的方法是分不好的, 很难得到纯品

多谢你了! 我的蛋白打算先过离子柱再过凝胶, 不知先过凝胶好不好, 因为离子柱可以浓缩体积。

先过什么看习惯或者需要, 如果不含盐我觉得还是先过离子交换好

我正在纯化一个蛋白, 用 AKTA 系统, Mono Q 预装柱, 分别用 0.1M NaCl、0.5M NaCl、2M NaCl 洗脱, 但是每个浓度的洗脱峰都有我的目的蛋白。请问是什么原因? 怎么想也不明白。

很正常, 因为你没找好合适的盐浓度, 或者电荷差别不大就这样, 何况离子柱的作用力不单纯。你可以直接走线性洗脱试试, 因为这柱子分辨率不错, 你这样走阶段是浪费它的潜力。如果还没分开, 那也许就不合适, 换别的柱子试试

我想用 Sephadex G-100 分离一个样品 (我的样品过阴离子是在穿透峰出来) 不知道选用 Tris-HCl buffer 还是 醋酸铵 buffer、醋酸钠 buffer 哪种比较好? 因为之前一步使用的醋酸钠 buffer, 没有脱盐就冷冻干燥, 是否对该样品蛋白质有影响呢?

凝胶柱子选择什么都可以, 无所谓, 关键看适合你自己的实验就可以。没有脱盐就冷冻干燥, 不会对该样品蛋白质有影响的

chromatography 老师, 您好, 再次来向您请教, 上次您教我在柱上酶切, (我具体的问题在 205 页) 我这次试了一下。具体过程如下: 6M 尿素溶解包涵体取上清 (样品中目的蛋白条带清晰) ——含 6M 尿素、20mM 咪唑的 binding buffer 平衡 Ni 柱——上样——6M 尿素、20mM 咪唑的 wash buffer 洗脱——6M 尿素、40mM 咪唑的 wash buffer 洗脱——肠激酶缓冲液洗柱——加 10ul 肠激酶的缓冲液保留在柱上——25 度 16 小时——肠激酶 buffer 洗脱。电泳结果没有我要的小片段的条带 (12% SDS-PAGE 应该没跑出去, 14k 条带离下面还有两厘米呢) 1. 难道是我的 EK 加少了? 还是最后洗脱的时候, 肠激酶 buffer 洗脱不下来? 2. 我判断我的样品应该还在柱上, 所以我决定咪唑梯度洗脱, 不加尿素了, 您看行吗? 3. 加了尿素的咪唑洗脱缓冲液 (用于 Ni 柱蛋白变性洗脱的) 能在 4 度长期保存吗? 不能的话多久会失效?

变性条件下你直接用酶切缓冲液洗柱子, 蛋白沉淀了, 这样沉淀蛋白酶怕是切不了多少的, 效

率也不高,因此你只能复性好了后才能切.因此实验不对也是没办法的

那 EK 的 Buffer 中有尿素也没有关系吗? 下次用含尿素的 Ek Buffer 先平衡一下然后酶切是不是就能成功了呢? 这个柱子中的蛋白是不是就没用了? 那用 EDTA 和 NaOH 洗脱能把变性的蛋白洗掉吗? 谢谢老师! 又给您添麻烦了, 但您的指导让我少走了不少的弯路, 谢谢您。

有尿素更不行,我猜测你柱子中的蛋白肯定还在,你可以用 6M 盐酸胍加 400mM 洗柱子这样就可以去掉这蛋白,我觉得你还是先看看文献做柱上复性后再酶切也许能成功.酶切我也不很清楚,你也可以发到外面问问

我试了 chromatography 老师说的线性洗脱, 0-0.1M NaCl, 0.1-0.2M NaCl, 每个线性都走了 10 个以上柱体积, 但仍然是两个线性洗脱的洗脱峰了都有我的蛋白。我不明白的是, 0-0.1M NaCl 线性洗脱时, 已经洗到了基线, 这里有我的目的蛋白。如果 1M NaCl 的洗脱强度不够, 那不应该能洗到基线呀。还有, chromatography 老师说的离子柱的作用力不单纯是什么意思?

首先蛋白电荷的分布不均匀,所以有时候会出现这样的情况,其次 mono 或别离子交换的填料在高盐的时候也会有疏水相互作用的干扰,所以作用并非仅仅是离子作用,你线性洗脱最好做 20-30 个柱体积,太短意义不大,我说的线性是直接从 0-0.5 或 1M,不是指 0-0.1M NaCl, 0.1-0.2M NaCl 这样,因为如果蛋白在 0.1M 左右洗脱,难免这两个洗脱都有目标蛋白,实验需要做和多摸索,还需要知道原理,所以需要实践和系统看书了解原理,这样才能做好

首先谢谢 chromatography 老师这么详细的解答。我已做了一段时间的纯化, 之前也看过一些纯化方面的书籍, 但感觉讲的都是些基本的、相似的基础理论, 比如它会说离子交换层析的洗脱主要通过改变 pH 和盐浓度来实现, 但就很少看到像你所说的“mono 或别离子交换的填料在高盐的时候也会有疏水相互作用的干扰,所以作用并非仅仅是离子作用”这样的话。我想再看看关于纯化讲的比较全面、深入的资料, chromatography 老师能推荐一下吗?

别客气,其实我也是大多有关蛋白纯化的书都读,而且在实验中看到这样的现象想到的,书上倒没这样写,很简单的例子是你如果用 2-3M 左右的硫酸铵可以把一些蛋白挂在 DEAE 或 Q 的填料上,有兴趣可以做试试,这就足以说明确实存在疏水作用力.因此每本书只是写作者的看法,需要兼收并蓄同时需要思考,灵活应用,所以只读书或者只读少数的书是不够的,还需要思考和实践,灵活应用,这样才能提高.mono 这样的聚苯乙烯类的填料虽然改性,但是还是有一些的疏水作用的,何况配基本身也会有疏水作用,所以这也是它非单一离子作用的原因

谢谢 chromatography 老师, 还想问一下 G-100 的流速最佳是多少? 我上次用的流速是 1ml/4min, 会不会太慢了? 要分离的两个组分是 50kd 和 95kd 左右。

稍微有点慢,你可以快点试试.不知道你柱子的大小,所以难判断,这填料也快不了,你可以选择 G75 试试,应该效果更好.我觉得最好别一看分子量有差别就选择凝胶柱子,也可以考虑离子柱等试试

我是一个新手, 遇到了这样个问题, 漆酶大小 60-100ku 最适 pH4.5, 木质素过氧化酶大小

38-46ku,最适 pH 2, 锰过氧化酶大小 40-50ku, 最适 pH5., 我要从同一培养基中分离出它们, 进行纯化。用阴离子交换柱层析分离, 不知道如何选择柱的大小及填充剂的型号, 如 DEAE- Sephadex A-25, A-50, A-75,A-100,纯化还要脱盐, 是不都要用啊, 还是选几个等?

这个问题太不好回答了,你是分别要分离它们还是说样品中这几个酶都有,我觉得你最好的方法是参考文献去做,这里怕给不了你具体方案,因为毕竟等电点都不知道是没办法选择离子交换填料的,新手建议还是先看实验书,再看文献然后才能做。

你好, 我用 G-25 的柱子, 上样之前跑了一个蓝色葡聚糖, 结果发现最后柱子的颜色变蓝了, 不知道什么原因, 是不是有蓝色葡聚糖没有跑出来啊? 是不是需要跑盐冲啊? NaCl 可以吗? 多大浓度啊?

G-25 还是有轻微的离子作用的,所以需要加点盐到 0.1M 左右应该没问题,当然也和样品有关,柱子颜色变蓝也正常,你需要继续加液体洗才能洗出来,如果出不来就加点盐洗即可

我准备跑盐了。还有一个问题, 我们实验室有个同学, 用的是 G-200 的柱子, 用三蒸水浸泡 48 小时后, 发现有团块现象, 于是又煮沸 3 小时, 装柱后还是发现颗粒不均匀, 不知道是不是凝胶本身的问题 还是处理有问题啊?

已经回复,最好买原装的,你问厂家或者卖给你东西的公司.应该不这样

谢谢老师了。上次我发的没说清问题实在是对不起。我看了资料的到了些信息: 漆酶大小 60-100ku, pI 为 4,木质素过氧化酶大小 38-46ku,pI 为 4, 锰过氧化酶大小 40-50ku, pI 为 4.5.。我 是要从同一培养基中都把它们分离出来, 进行纯化。使用的缓冲液 pH 在 5.5, 要用阴离子交换柱层析分离, 由于实验室条件有限, 选择了柱大小为 1.6 x 40 cm 和 1.6 x 20 cm, 纯化还要脱盐, 脱盐用的是透析法, 关键是要用什么填充剂及型号, 如 DEAE-Sephadex 或 DEAE-BioGel.如何才能达到高纯度, 请老师指教, 谢谢。

Q 或 DEAE 琼脂糖凝胶或 Q 或 DEAE-sepharose FF 最常用也比你列的那些好用, 纯度是看你做的条件, 没办法预测, 你需要做了才知道. 1.6 x 20 cm 做柱子小试就可以

我有一些 sepharose cl 6B, 由于长时间不用好像长菌了, 水洗都会堵柱, 请问现在还有没有可再生的方法?

0.5M NaOH 泡半小时,然后混悬,让填料沉淀,去掉上面的液体,用水反复混悬去液体,直到液体澄清为止,然后装柱子,再用 6M 盐酸胍洗.也许勉强能用

谢谢, 但是胶里有很多黑东西, 悬浮不出来, 它也会跟着沉到下面, 我们没有盐酸胍, 是不是用强变性剂, SDS 可以吗?

SDS 不一定能使一些蛋白或者别的东西溶解, 你试试吧. 黑色的应该是别的东西, 实在去不掉那也是没办法, 无论如何别指望能和新的一样, 处理后不堵, 能用就不错了

chromatography 老师, 我想装一根 VYDAC protein C4 柱, 不知道具体如何装柱, 而且没有

该介质的说明书或者详细的装柱方法。特别是不知道如何溶胀干胶，只是听说丙酮溶胀再换乙醇，具体的就不清楚了，不知道 chromatography 老师能否帮助我解决这个问题，谢谢

这应该是 HPLC 的填料,自己是没办法装的,需要装填的机器,我看都是预装这样填料的柱子,你最好是问厂家,因为这些填料不同公司是不一样的,特性和注意点只有他们最清楚,所以要是买填料选择有售前和售后服务的公司很重要,否则白费钱和时间

请问,最近实验需要 ni 柱,发现实验室的 ni 柱干了,这种情况应该怎么办?

缓冲液冲到没气泡应该还能用,实在不行就取出重新装.反正我们的镍填料即使全干都能涨回来

我有个问题想问一下。我用 pET-32a 原核表达的细菌,超声获得的上清。我用 Qiangen 纯化,可是纯化之后的非特异条带非常多。我想通过调整咪唑的浓度分段洗脱,希望能将非特异条带洗脱。留下我要的蛋白。但是效果很不好。目的蛋白也有很多被洗脱,想请问一下,还有什么方法可以让我活的纯度比较高的目的蛋白。接下来我要作动物免疫。

说过不少次这个问题,首先要留意样品本身破碎要温和,上样的浓度不能太高,此外可以选择 20, 50, 100, 400 mM 咪唑做阶段洗脱,希望缓冲液中可以加 0.5-1%吐温,如果还没改善,可以在咪唑洗脱前加 pH5 0.2M 的醋酸缓冲液洗 3-5 个柱体积.还有个问题是上样量不能太少,否则到最后目标蛋白太少,电泳都跑不出,所以不知道结果.发一份我们的材料给你做参考

你好!我最近纯化一个 68kda 的蛋白,经过 DEAE 柱后有一个 45kda 的蛋白一起被洗脱下来,用凝胶柱 sephadex g-75 分离,用的是 80cm 的柱子,直径 1.6cm,流速 1ml/min,感觉柱子有点堵,是不是流速太大,导致凝胶柱堵塞,分离的结果也不好,两个蛋白没分开,一个蛋白峰洗脱了 60min,请多指教!另外,纯化蛋白使用凝胶时是不是一定要用大于 60cm 的柱子,用短一点的可以吗?老板让我把这个蛋白的纯度做到 99.99%。我该怎么检测纯度,谢谢!

sephadex g-75 这个填料流速不比较慢,所以你可以降低流速,同时减少上样量,凝胶柱太短效果会很差,上样最好能先把下口封住,上样完再打开,这样会比较好.此外很难预测分离效果,你只能自己看材料,多思考,多尝试.

您好,我用的是安玛西亚纯化系统,自动上样。请问凝胶缓冲液中必须加 NaCl 必须加到 0.1M 吗?不加盐可以吗?谢谢!

最好加点,除非你试过不加没影响.

看到贴子里很多人做纯化时,饱和硫氨沉淀后都要先除盐后再继续下一步纯化;但我一般硫氨沉淀后就直接拿上柱平衡液吹溶,后用 0.22 滤膜过滤一下,就直接上柱了。请问这样影响大吗?

没影响就好，没什么是一定的，适合自己就好

我现在向单纯用分子筛原理提纯我的样品，分子量较大，我查了几个分选范围差不多的填料，但不知哪个较好也叫经济，有 Bio-Gel A 150m, superose 6, superdex 200, sephacryl S-400HR, 我要分离的是多糖，具体分子量不是很清楚，差不多 1000-100 000 左右吧，想选一个分离效果较好又不是太贵的凝胶柱，现在还没选好呢，所以向你求助一下。

你不说蛋白分子量范围我没办法说哪个更好，但是就刚性和效果而言，也许 superose 6, superdex 200 不错，而 sephacryl S-400HR 次之，Bio-Gel A 150m 刚性不错，但是颗粒大，所以分离效果应该一般。经济的话就是 sephacryl S-400HR。最便宜。Superdex 200 分离效果更好，但是以你的范围，那选择 superdex 75 就足够，糖和蛋白不同，需要选择小一号的填料，当然只过这柱子怕也难有特好的效果，还需要配合别的色谱。

我的样品用水不能溶解，改变 PH 值后溶解过 g 25 柱，用水洗脱有没有堵柱的可能性，如果不行，应该怎样选择洗脱液？

最好选择缓冲液冲柱子，p H 和你的样品一样就可以。

最近实验遇到了很多问题，还得麻烦你一下，我的多糖样品要过琼脂糖凝胶柱分离，但发现水不溶，用 1M HCl 才能溶，那我该怎样选择洗脱液呢？

很少有多糖填料能耐受这么强的酸的，何况这样情况下你的糖糖也很难不降解，你只能多试试看还有什么更温和的方法能溶解，否则不好做。

我用 His•Bind Quick Columns 纯化蛋白，上样后用 Binding 洗不下来，wash 也没洗下来，不知道是什么原因，我估计要么是我配的 buffer 有问题，蛋白根本没有结合上去，在我上样的时候就流下来了，要么是结合的太牢，没洗下来，我该怎样分析，是什么原因呢？

你的蛋白是不是包涵体，样品要和缓冲液的体系一样，避免沉淀，检测穿透的样品看你目标蛋白的含量，如果没变化也许没挂上，如果少，总之要留意样品的问题，先看是吸附还是没吸附在说，可以去点吸附后 Binding buffer 清洗过的填料加电泳缓冲液跑电泳，如果没目标蛋白就没挂上，有再看看清洗的问题。没有就是吸附的问题，有的进口的填料吸附力弱，你可以看填料的颜色，非常淡的镍少，作用力也弱，颜色深的作用力也强。

我用葡聚糖 G-75 装柱，结果纯化出来，跑的图谱就一个峰，觉得并没有把我要的目标物纯化出来。用的是波长为 280nm 下的检测。选用的是 80cm 的柱子，装柱高度是 60cm，浓度为 15mg/ml，洗脱流速为 3ml/min，你看问题可能出现在什么地方啊

柱子有多粗呢，分不开也正常，你样品的分子量范围是多少，尽量加长柱子，减少上样量，凝胶柱分离效果不会太好的除非你样品分子量差别很大，流速太快建议见少，上样一定不能多，自己多看实验书多尝试，好运

单克隆技术做的单克隆抗体，抗原为高度糖基化的中性糖脂，抗原决定簇在糖链上，如何求

得抗原，请 chromatography 专家指导，谢谢

如果已经有抗体，并且足够多的话，那你可以直接把抗体偶联到活化填料上去做免疫亲和就可以，如果没足够的抗体，那只能选择常规的方法。

我们这样做了，目的条带是 100KD,western 也验证了，可是做抗体偶联到活化填料上去做免疫亲和跑 2-D, 质谱鉴定为抗体的重链，纳闷中，重链都是在 50KD 左右。是否是抗体污染？但是这个抗体 WESTERN 很难做，按理亲和性不如别的容易做 WESTERN 的抗体，别人的高亲和性的抗体，目的分子也在 100KD, 质谱鉴定却没有发现重链。怀疑为与抗体重链高度同源的分子，可能为新分子，以前推测有高度糖基化，如何鉴定？数据库无糖蛋白数据库，是个挑战啊。

我怀疑抗体偶联没做好，至少填料本身没做成功，对你的实验我不是很清楚

请教！我自己用高碘酸氧化法用 Sepharose 交联了 IgG，效果还不错。但是老板想进行冷冻干燥以减少体积（湿胶的体积比较大），他的理由是买过来的 CNBr-Sepharose 就是干胶。我查了一下丁香园，大家都认为冷冻过的胶对亲和层析没有问题，但是没有说到 IgG（我比较认死理，见谅。）后来我查到 amasham 的 ProteinG-Sepharose 上说 must not been frozen。所以就更拿不准了。不知道能不能进行冷冻干燥？！

不加保护剂冷冻干燥怕不大好,特别是琼脂糖凝胶结构也许会变的,你可以先取 1-2 毫升做个小试看看,如果没问题就可以.

现在检测到的抗原 A 有抗体的性质，但是抗原 A 具体是什么分子不知道，请问如何纯化分离抗原 A,使抗原 A 能当一个抗体用（主要用于 WESTERN)

这我就不很清楚,但是你可以选择能和你抗原结合的那蛋白或物质固定到填料上去纯化抗原应该是可以尝试的方法,如果不行,那你只能选择常规的方法去纯化.

superdex30 柱用的时间长了，怎么处理一下？重新装柱可以煮沸一下除菌么，煮多长时间可以？如果用氢氧化钠处理浓度及体积是柱体积几倍？有温度限制么？

最好是参考它的说明书去清洗,通常如果没染菌并不需要煮沸一下除菌,清洗的方法说明书都很详细,氢氧化钠处理,可以选择 1M 洗 5-10 个柱体积,常温即可.但是这样并不算彻底清洗,所以按说明书做是最好的方法.

我是一名临床医生，最近实验需要分离病人血浆中氧化白蛋白。白蛋白的分子量是 67kd 左右，氧化后有单体、二聚体和六聚体形式，其中单体的分子量改变很小，只有几十 Da。用凝胶层析最适用，但我从来没有接触这一块领域，有些茫然。咨询一些人，答复都是“找一种柱子”过滤就可以了，但是该如何选择啊。望赐教。

你说的问题并不是象他们说的那么简单,首先你需要先把白蛋白亲和纯化出来,你可以选择蓝色琼脂糖凝胶,然后再过凝胶柱子把单体和聚合体分开,不知道你是不是这样的意思,但是要

想把它们完全分开你也许需要买 HPLC 的凝胶柱子,而普通的怕是很难分开,至少也需要预装柱,但是你没机器的话那也不好办,所以一言难尽,方便请电话联系

请问楼主我用 DEAE Sepharose 提纯人免疫球蛋白,但是放置一段时间后出现雾状,不知是什么原因,还有,提纯时的 PH 是 6.9 好还是 7.2 好? 电导是多少好啊? 非常感谢!

抗体本身疏水性强,而且等电点在 7 左右,所以你可以调 pH 到 6 或 8 也许好点,同时可以加甘油或表面活性剂这样避免聚集沉淀.

您好,我有两个蛋白需要分离,它们分别是 68kda 和 45kda,如果我选用凝胶的话使用 superdex G75 好还是用 sephacryl s-200 好,请指教,谢谢!

肯定是 superdex G75,因为颗粒小,同时分离范围窄,效果会比 sephacryl s-200 好,但是要完全分开那也许需要运气,或者要尽量装好柱子,少上样也许效果更好,同时也可以考虑离子交换等别的方法,别只看分子差别就选择凝胶柱子,因为离子交换的填料也可以选择颗粒小的填料,这样效率高,分离效果也好.

我对阴离子树脂处理后的组分进行 G-25 除盐, 1.6×50cm, 流速 1ml/min, 跑完后, 280nm 检测, 但是发现物质和盐几乎是同时出来, 效果很不好! 请问这是为什么呢, 是 G-25 不好, 还是其它原因, 忘指教!

样品的分子量要大于 5000, 否则分不开, 此外分管收集, 避免混合. 如果样品没问题, 那就留意填料有没有错.

chromatography 老师您好! 我的蛋白经过几步纯化后, 用电泳和 hplc 检测纯度. 结果 hplc 上面一个峰, 还原电泳几乎只有一条带, 但是非还原电泳有很多条带. 所以, 我们考虑在纯化中提高巯基乙醇的含量. 我不知道一般纯化溶液中巯基乙醇含量是多少. 以前我们一般是 2mM 或者不加. 现在我把巯基乙醇的浓度提高到 10mM. 结果在跑疏水柱的时候发现, 洗脱结果和以前不一样了. 以前 70% 的 1 当量硫酸铵会除掉很多杂蛋白但是目的蛋白是不会洗下来的; 这次却发现目的蛋白大部分在 70% 的 1 当量硫酸铵情况下洗下来了. 我该怎么办啊

非还原电泳的带多, 而还原的是单带, HPLC 又纯, 这很难解释, 你可以做 HPLC 凝胶柱子看看, 如果是单峰那应该是纯的, 就算是聚合物那如果对活性没影响那也可以直接用凝胶柱子去把单体和聚合物分开, 而对单体和聚合物用疏水或离子交换怕是没意义的, 因为分不开, 而你疏水色谱的现象也许是高还原剂存在下导致蛋白结构变化, 而导致疏水性的变化, 同时巯基乙醇能减少疏水相互作用导致吸附力下降也有可能, 总之如果是聚合物等凝胶柱子也许是最好的选择, 此外如果能找到产生聚合物的原因那也可以另想办法.

我正在做多糖疫苗分子量的测定, 用 CL 2B 的柱子, 用葡聚糖 2000 测空水体积, 由于 2B 的孔径为 4000 万, 而葡聚糖 2000 的分子量最大才为 200 万, 效果很差, 能请教下 2B 怎么测吗, 药典上没说..

测这个有什么意义吗, 如果你能检测样品, 不需要测定外水体积, 此外多糖是链状的和蛋白球

形的不一样,因此应该选择分离范围更小的,除非有文献是用现在的填料,所以你要先看你样品的分子量再选择。

chromatography 老师, 请问一下 cibacron blue-sepharose 是不是 wsac 上资料中的蓝色琼脂糖凝胶? 它是疏水层析的填料吗?

cibacron blue-sepharose 是 www.wsac.cn 上资料中的蓝色琼脂糖凝胶,属于染料亲和,不属于疏水层析.

有一蛋白混合物(经蛋白与其它总蛋白反应,蛋白进行了寡聚化,同时其它蛋白也水解了,跑 SDS-PAGE,发现寡聚化的蛋白染色较浅,但仍清晰可见,同时泳道上还有 60KDa 及小于 60KD 的蛋白),现行想小量制备其中寡聚化蛋白(250kDa),不知用分子筛能否分离?用什么分子筛较好?

sephadex G75 或 sephadex G100 等者类似这样填料分离范围小于 8-12 万的都应该可以. 只是这些填料软,有条件可以选择刚性好颗粒更细的填料.

我想在离子交换之后,再做分子筛,很久以前的文献上有用 ultrogel AcA 22 (LKB 公司),不知道现在是否有新的凝胶填料替代它,并且对操作的要求不是很严格?我要的目的蛋白分子量在 33 万左右.实验室条件不是很好,需要自己装柱子.

分离范围 100000~1200000,你最好还是选择分离范围窄的填料即可.

您好!最近在做一个包涵体蛋白的变复性后的纯化.已经很久了也搞不定.大概情况是这样的,我用 8M 的尿素的变性液溶解,然后用含 PEG、甘油、精氨酸的复性液梯度复性,复性率大概有 60%左右,可是过亲和柱的纯化效果不好.我用的是几丁质的亲和柱,上样后的穿流峰中已经冲下了一些没有正确折叠的目的蛋白,20 小时诱导剪切后收集的蛋白样品中却仍有未剪切的目的蛋白在,浓度很稀啊,剪切下来的小分子 8KD 左右的小肽在 Tricine 胶中根本看不到.该怎么办呢?该怎样优化纯化条件呢?还有我想问,如果那个尿素在透析过程中不除干净,是否对几丁质亲和柱料有损害作用?如果把含有低浓度尿素的蛋白过几丁质柱的话,在柱上冲掉尿素后,可溶的蛋白是否会形成沉淀析出而堵住柱料呢?会对蛋白的剪切效率有影响吗?

复性是很复杂的过程,即使稀释能溶解不一定表明就复性成功,所以我觉得还是复性的效率低,如果已经能吸附到柱子上,那你只能浓缩样品后再检测,或者想办法改变诱导表达的条件得到可溶性表达最好.尿素去不干净也许影响结合,但是不同的蛋白情况不同,所以只要能挂上就可以不考虑这个问题,当然如果复性不好,有可能去掉尿素后会又沉淀堵柱子,这样肯定会影响柱子的载量,所以我觉得你还是去干净再上的好,对这融合蛋白不很熟悉,所以你也可以问问公司的技术支持.

大师可否指点一下如何将 IgG 偶联到 CNBr-activated Sepharose 4B 上,我做的效果总也不理想!

那你能否告诉我你是怎么操作的,需要强调的是洗 CNBr-activated Sepharose 4B 后马上要偶联,否则时间长活性下降偶联效果差,此外要留意你偶联样品的 pH,具体的原因要看你操作才

好分析.

我是这样做的：先以 1mM 的盐酸洗涤冻干粉状态的 CNBr-activated Sepharose 4B，然后在 pH8.3 的条件下进行偶联，室温下轻微震荡实现。洗涤的时间有影响吗，要求迅速？在室温下偶联应该可以吧？IgG 比较偏酸，pH8.3 远离其等电点，应该可以较好地结合吧？

你写的还是不详细,例如 1mM 的盐酸洗涤冻干粉状态的 CNBr-activated Sepharose 4B 多长时间,这步骤时间越短越好,此外偶联 pH8.3 是什么缓冲液,多大浓度,偶联多长时间,你抗体的浓度是多少,偶联的时候是不是浑浊抗体沉淀等.

填的是一预处理微柱,洗涤液是靠重力自由下落的,整个过程下来大概要半小时左右,若缩短时间也许可以以推杆将之推下;偶联缓冲液是 0.1M 的 NaHCO<sub>3</sub>,含 0.5M NaCl,室温下轻微震荡 1.5h 实现偶联;抗体的具体浓度不好确定,我是将 250 微升的血清溶于 5ml 的偶联缓冲液中,;偶联时没发现抗体沉淀的现象.我一直以为反正是一液相的反应环境又不停地震荡,抗体的浓度高低与偶联效果有什么关系吗? 还有我想请问一下您有没有试过以染料为配基进行亲和层析纯化抗体?

洗的过程看起来没什么问题,但是时间最好能快点,10 分钟左右最好,偶联一般不需要加 0.5M NaCl,这样如果也许对溶解度不好,而血清如果不纯化直接偶联这样偶联太多的白蛋白,抗体浓度不高,自然是很难用它去做别的实验的,因此我觉得你的问题是抗体不纯.抗体浓度高才能效果好,太低又不纯那偶联的杂蛋白多.染料亲和纯化抗体原理是用它去血清中的白蛋白得到比较纯的抗体,不过有时候也有人用,只是不常用,还是选择蛋白 A 亲和纯化的多.

偶联的杂蛋白不会影响后面的反应,抗体纯品价格较高所以才想以抗血清先做一预实验,效果好再以纯品继续,但是结果一直不理想.我在寻找一种除了蛋白 A、G 以外的可以与 IgG 较好结合的配基,价格比较容易接受的.也没有什么好的解决之道!

不一定不影响,尤其是你抗体含量不高的情况下.所以我觉得最好先纯化抗体,否则浪费钱和时间,因为活化好的填料偶联后就不能再用,你也可以把你抗原偶联去纯化你的抗体,再偶联也是可以的,如果抗原比蛋白 A、G 便宜,那是纯化多抗不错的选择.此外没别的更好的方法.

我的这个融合蛋白在尿素浓度降低到 0.5M 左右效果取样跑胶发现沉淀的很少,可溶的蛋白量在 90% 以上,完全除去尿素 0M 后才有蛋白析出.可是文献上不是说尿素浓度到 2M 不就已经复性结束了么? 您觉得如果我用这个浓度的蛋白样去上柱,延长孵育时间等蛋白结合充分了再用平衡缓冲液去冲掉尿素,这样的效果会不会好些呢? 因为透析的条件已经摸了很久了才做到这个程度的,该想的办法该做的条件优化都做了,溶解的情况算是这么多次来最好的了,感觉都已经无能为力了,所以想或许是我这个纯化条件没摸好所以影响了挂柱的效率.

复性后的溶液最好能用你的上样缓冲液透析,这样避免因为环境变化导致沉淀,不同蛋白复性差别很大,所以没文献说明 2M 尿素对所有蛋白都是复性成功的,我觉得具体的填料使用还是问公司的会更清楚些,复性不是很容易的事情.很难有规律可循.

**Question: have you purified the mouse mAb in serum contained media? which process? Sigma's goat anti mouse IgG agarose did not work well, it eluted the IgG at pH2.4, mess up the protein.**

如果是普通的血清中的抗体纯化,那直接选择蛋白 A 或 G 亲和填料去纯化即可,步骤很简单,通常公司产品的说明书都有.如参考 G E 的说明书,操作和使用 IgG agarose 差不多,如果你选择 IgG agarose 纯化有杂带,那平衡缓冲液可以加点盐避免非特异吸附,但是这样纯化成本比前者高,而且载量不高.

Serum contain bovine IgG, which maybe interfere the use in EELISA in future, so, question is how can I remove the bovine IgG after Protein A or G?

抱歉,理解错误,也许开始你说清楚点就不会误解了.如果是这样那你选择 anti mouse IgG agarose 可以用不同的 pH 去洗脱,如 5, 4, 3, 2.5 这样也许能把它们分开,毕竟亲和力和力有不同,当然也可以用 Protein A or G 纯化,采用不同 pH 洗脱,看能否把它们分开.你也可以用 EELISA 试试有没有污染 bovine IgG.还有就是如可能最好能用无抗体血清.这样能避免后期的纯化麻烦.如果都不行,那你就选择用 anti bovine IgG agarose 去除 bovine IgG,不知道行不行.

请问强阴离子填料 Q 和弱阴 DEAE 的区别仅仅是强阴比弱阴的 PH 范围要大一些吗, 有没有结合力方面的差异呢? 对此非常迷惑

理论上应该是这样的,但是实际情况如何没做过对照.

我有一个融合蛋白 20KD 左右, 有 6 个组氨酸标签, 用 Ni 柱纯化的, 除盐后用甲酸水解获得目的肽 (5KD 左右), 水解完旋转蒸发后真空冷冻干燥, 但是干燥完后再用含 10mM 咪唑的 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 6M 尿素溶液溶解会出现沉淀, 之前纯化的时候融合蛋白在含 10mM 咪唑的 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 6M 尿素溶液中溶解性很好. 跑 sds-page 发现, 沉淀里有融合蛋白, 目的肽和融合蛋白的另外一部分. 想知道为什么会这样? 怎样可以提高干燥后的蛋白在含 10mM 咪唑的 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 6M 尿素溶液中的溶解性? 万分感谢!

沉淀的主要原因在于你水解不完全,你可以延长时间或者提高温度,然后检测什么条件下水解比较完全再浓缩,蛋白一旦沉淀成一块是很难溶解的,你也可以提高温度,延长时间或者超声助溶.

请问所谓的低盐上柱, 高盐洗脱指的低盐、高盐的标准是什么呢? 500mM 的 NaCl 算高盐吗? 50mM 呢? 还有对于不同的蛋白质, 有什么方法可以知道盐浓度是多少时不会使蛋白沉淀析出呢? 我现在怀疑我的包涵体蛋白可能不是因为复性不完全才在 0.5M 尿素浓度时产生沉淀的.或许是因为我换的缓冲液中的 500mM NaCl 浓度不适合目的蛋白而被盐析出来的.

低盐上柱, 高盐洗脱通常是对离子柱而言的,500mM 的 NaCl 算高盐,50mM 不算,但是那也看什么蛋白,我们也发现有的蛋白大于 10mM 挂不上离子柱的,小于就可以,所以没确切的定义,都是相对而言的.至于复性样品是很难说的,你只能自己去做对照实验才知道,你也可以去掉盐如果效果一样,那说明盐没影响,如果有不同,加盐沉淀更多,说明是有影响.

实际上我是用抗人 IgG 去亲和人血清中的 IgG, 所以如您所讲的以抗原先纯化抗体之道并不可行! 莫非我只能以蛋白 A、G 做亲和层析的配基? 呜呼……

我说的抗原不是指抗人 IgG,而是指你抗体能结合的抗原,当然如果你没有,那也只能选择蛋白 A、G 或 L 去做配基.

但是我查过一些资料,也实验过比较多次,但还是发现甲酸水解我那个蛋白最多能水解 60%,我用的条件是 45 度,24 小时,70%的甲酸。我今天用 6M 的盐酸胍试了一下好像好了点,沉淀少了很多。想知道有谁做过甲酸水解融合蛋白的,能水解百分之几?有没有更好的条件让我的融合蛋白水解的更充分些?

你可以提高甲酸浓度,提高温度试试,这些都没做过,你只能自己试,此外盐酸胍溶解能力是肯定比尿素的强.

我试试看盐浓度的影响有多大。可是有什么办法可以看一种蛋白的盐析点在哪呢?具体操作怎么样?

不同蛋白不一样,你可以往样品中加盐,出现浑浊那就说明开始有蛋白沉淀.

有一问题请教您:我现在欲纯化鱼血浆内一分子量约为 450KD 的高分子蛋白和鱼组织内一 20KD 左右蛋白,请问一下我选择 10\*300mm,填料为 superdex 200 的预装柱是否可行?上样量多少最好?superdex 200 填料的强度大吗?因为以前用的 sephadex G200 填料强度特别低,很容易压碎,都怕了!

如果你有能连这柱子的进口机器的话那就可以选择这样的预装柱,上样估计也就不到 1 毫升吧,因为这柱子体积也就 20 毫升多点.强度应该是没问题,只要按说明书操作应该不会碎的.

毕业后在公司做纯化,了解得很少,有个紧急的问题请教下:我们用一个 Sepharose 4B 偶联 2w 分子量的蛋白做亲和介质,亲和前使用的是 SP Sepharose FF 粗纯化,原料是毕赤酵母发酵液。亲和介质用了大概 15 次后从外面看到一圈圈黑的,今天忍不住把柱子拆了,发现只有贴壁的一圈是黑色的细块状杂质,我搅匀后放在烧杯里面,那些黑色杂质都沉到杯底了!发酵的同事说可能是泡敌之类的油脂。现在的问题是,如果不管这些杂质,再装回去,那杂质就首先沉淀到柱底,没法做纯化了。我用 0.5MNaCl, 0.1MTris-HCl pH8.5 溶液/0.5M NaCl,0.1M NaAc pH4.5 缓冲洗过,看不到效果。现在不知道怎么办了

那些应该是一些不溶解的杂质,没什么特别好的方法去掉,所以一定要上柱子前样品和溶液都过滤,此外有的泵也因摩擦有一些细屑,这都不好说,实在没办法也只能把那些上面黑的去掉.

现在在做 3k 以下的多肽的分离和纯化,关键是我所分离的多肽溶液里含有很高浓度的乳糖和盐分,我现在采用的是葡聚糖-15 来分离,洗脱液采用的是蒸馏水,这个效果不好,想请教一下能给我一些关于本实验的建议吗?我该如何进行实验,现在有点乱,不知道该如何进行。

如果知道等电点,建议先用等电点沉淀,或者稀释后先过离子交换,凝胶柱子处理量小,分离效果差,建议和别的方法配合,也可以用超滤试试.

我手头有一种从海洋生物体中抽提的小分子多肽,羧肽酶作用之后,细胞毒未见异样,所以怀疑是环肽,下面想用反相硅胶在常压或低压下进行液相色谱,现在遇到一些问题,想请教一下老师: 1、选用的填料柱是不是用常用的硅胶柱层析柱就行。2、因为组分会很多,所以用细胞毒的方法就会很麻烦,不知道有什么好的方法进行各种组分。

我觉得你最好是查文献看类似物质都是怎么分离的,如果是常压或中低压下进行,那可以选择硅胶,反相硅胶或者氧化铝等填料,检测你也许需要对不同物质用不同的方法,很难说清楚,我只做生物大分子,小分子的也不熟悉

我有一个糖蛋白,分子量在 25-30 之间,经过 SP FF 一步纯化后,还有在约 66kD, 100kD 明显的杂带以及 45kD 模糊东西(也可能是糖蛋白)。计划拿我的蛋白做单抗,想用分子筛进一步纯化,希望能给些建议。我查到常用的凝胶过滤填料有 sephadex、superdex、sephacryl 等,根据填料分离范围的上限尽量接近目的蛋白分子量(从电泳上看,杂蛋白都比较大),分离范围又尽量小的原则,sephadex G 75 (3000-80000)、superdex G 75 (3000-70000)、sephacryl S 100 (1000-100000) 比较符合。我就是不知道这三种填料之间的区别在哪里,各有那些优缺点? 或者是否还有其他填料更适合? 我的设备是 FPLC, 16/70 空柱。

最便宜的也许是 sephadex G 50,如果不好用的话,那最好用的应该是 superdex G 75,别的都可以不考虑.sephadex G 太软,流速慢,sephacryl S 100 稍微好点,但是通常分离范围宽,硬度不及 superdex ,因为颗粒也比 superdex 大,所以分离效果也差点,而 superdex 颗粒细,分离效果更好点.

再请教一个问题。平时在作离子,疏水等层析时,根本没有去考虑柱子的长短情况。现在作分子筛,我就知道柱子越长越细,效果约好。不知道这个长/直径的比例是多少为宜? 具有相同比例,但长短不一,效果会有差别吗? 或者只是影响上样量(体积肯定减少)?

其实要是做离子,疏水等层析如果需要线性洗脱那也是细高的柱子分离效果好,但是如果用阶段洗脱就无所谓,凝胶柱子也看你什么目的,如果是脱盐这样,一类分子走外水体积,一走内水体积那就不需要特别细高,但是要不是这样的,那就要选择细长的柱子,一般至少需要直径/高度应该大于 30 以上为好.上样量自然也是越少分的越好.如果不清楚可参考实验书吧,我觉得书上更系统全面.