* 确定蛋白，找到蛋白的DNA序列，根据序列设计引物，由生物公司合成。 **引物设计：**NCBI 中primer blast。确定切割载体质粒的酶，PCR一段质粒酶切位点前的序列，将序列连接至引物上。PCR检验连接是否成功（片段比引物长）。**PCR参数：根据酶调，酶一般有说明书。**

1. 连接。载体质粒双酶切。

**酶切体系：70ul**

**酶1 1.5ul，**

**酶2 1.5ul，**

**质粒 50ul，**

**ddH2O 10ul,**

**10\*fast digest 7ul（跑胶不需加loading buffer））。**

**37℃培养箱，1.5h或至2h。**

引物连接载体。

**连接体系：**

**质粒 2ul，**

**PCR产物 2ul，**

**酶 1ul。**

**水浴50℃，15min，剩余5min时-80℃取**

1. 转化。质粒转化进大肠杆菌。培养基中加相应抗生素（存活的菌内都含目标质粒）。

50ul感受态（冰浴化开5min）+2.5ul质粒，轻轻吹打，冰浴30min，42℃热激90s，冰浴2-10min；

加入到0.5ml LB培养液中，4000rpm 3min，弃200μl上清，剩余吹打混匀涂平板（抗性），吹干，倒置，37℃，12-24h。

3、转化成功后挑菌送测。测转化进去的片段。

培养：挑取单菌落至5 mL试管（LB,Amp+Chl（抗生素根据菌及质粒抗性确定））,过夜培养后按1：100比例转接入2个100 mL三角瓶（LB,Amp+Chl），

培养4h至OD600 nm=0.8-1.0，按1：100比例转接入1L大三角瓶（LB,Amp+Chl））培养，

37oC，180 rpm培养4 h至OD600 nm=0.8-1.0，调整温度转速为15oC-18℃，150 rpm（诱导表达），降温后30min加入iPTG（0.05-0.6mM），培养12-16 h。

加相应抗生素，需在培养基冷却至大约40℃再加。

1. 收菌。菌液转移至离心管中（1 l/管），5500-6000rpm，15min。配平可直接加水。

5、压力破碎。压力破碎仪破三遍。

**Lysis buffer (1L)（左为终浓度，右为1L中加入的母液体积）**

40 mM Tris, pH 7.9 40ml 1 M Tris, pH 7.9

200 mM NaCl 50 ml 4 M NaCl

5% 甘油l 100 ml 50% 甘油

2 mM EDTA 4 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0（起泡，加碱才溶）

2 mM DTT 2 ml 1 M DTT

**0.1 mM PMSF 0.5 ml 0.1 M PMSF (**酒精溶解）**)**

H2O 804ml H2O

裂解液**Lysis buffer**重悬。使用 Lysis Buffer（1L菌用30ml重悬）（预冷）重悬菌体沉淀，转移至冰浴烧杯中；菌搅拌均匀，无气泡无颗粒，

* 压力破碎：预冷压力破碎仪
* 上样前ddH2O 冲洗仪器 3 次；
* 加入Lysis Buffer 润洗管路；
* 上样破碎3次；
* Lysis Buffer冲洗管道；ddH2O 冲洗 3 次；75％酒精封存；
* 台面左键停，调压力为0，放气，关右键，关总开关；

6、离心：将烧杯中的破碎物转移至离心管中，配平后，10000~12000 rpm、4℃离心45 min，将上清转移至烧杯中，等待过柱；

**若为膜蛋白则操作。超速离心。**

**转子提前放4℃冰箱预冷，精确配平，设置44℃，39000rpm，1h，保留沉淀。**

**超离有专用离心管，配平，拧紧转子盖子，将转子放入超离，放置合适时会有声音，盖好盖子。设置参数，密码1502，启动，等升速结束后再离开。结束后，先释压，再开。**

**用32ml无EDTA的lysis buffer +8ml 10％DDM（去垢剂）+40ul0.1M PmsF（保护剂）重悬，4℃旋转混合过夜。**

**超离。39000rpm，30min，保留上清。**

7、过His柱，洗脱目的蛋白。所用lysis buffer（无EDTA无PMSF)，Ni 柱的各种 Buffer 不需要抽滤，一般不会堵住。

（加各种液体时沿壁缓慢下流，可用枪加不要将镍柱冲起来.。第一次洗脱蛋白不确定其是否挂柱，要用烧杯接住洗脱的蛋白溶液用 Bradford 检测（200 μL Bradford + 20 μL 蛋白），颜色越亮蓝色蛋白浓度越高）

1. 装柱：取 2-3 mL的镍柱琼脂糖树脂（ Ni Sepharose 6 Fast Flow ）装柱，并使其自然洗脱；
2. Ni柱平衡：1个柱体积lysis buffer（无EDTA无PMSF**)含0.02％DDM**（膜蛋白加），自然洗脱
3. 上样，两遍
4. lysis buffer（无EDTA，无PMSF） 冲洗25ml
5. Wash：15-20 ml（一个柱体积） 30mM（根据蛋白适当调整）咪唑（用无EDTA、无PMSF的lysis buffer配），清洗杂蛋白。（20ml ：120ul的5M母液）
6. Elution：15ml 300mM（根据蛋白适当调整）咪唑,收集洗脱液。（15ml ：0.9ml的5M母液）
7. 25 -50mL 500mM咪唑清洗柱子（洗脱所有蛋白），1~2个柱体积ddH2O冲洗，1个柱体积ddH2O，堵住并保存Ni柱。（50ml：5ml的5M母液）

8、阴离子交换柱

A液：50mM Tris HCl ph 8.0+0.5%甘油

（1L:50ml 1M Tris+10ml 50%甘油 ）

B液：50mM Tris HCl ph 8.0+1M NaCl

（1L:50ml 1M Tris+250ml 4M NaCl）

1. 将 A、B 相配好并抽滤，先 A 后 B 无需洗抽滤瓶（若与分子筛同时抽滤，则需要清洗一次抽滤器皿），
2. 仪器停止，用水冲洗AB泵头，分别放入AB液中。
3. 检查3线上的滤膜有无。
4. 保存本次实验，Manual — Other — Record on-对话框-文件夹-命名（一般为日期-蛋白名字）
5. 清洗泵头。Manual —pump—pump wash basic，两个泵头调为on，3min左右系统自动停止。
6. A液冲洗系统。conc 0％B，流速flow10mL/min（可以视压力情况而定），压力pressure不超过 3.5 MPa。A液流过20ml左右即可。
7. 设置流速不超过 5 mL/min（通常为 3 mL/min）
8. 装柱。Amla蛋白使用15 Q（酯酶组）柱子。仪器**后侧线**连接柱子**上端**，将柱子上帽拧下，用上向柱里滴水，同时下端拧松，上端水满后拧紧，等下端出水后拧紧。装好观察是否漏液。

AB也交替冲洗。A 相（0% 的 B）冲平（棕色线cond），B 相(100% 的 B)冲高后平，冲至UV线的峰基本无变化。（AB交替冲时UV会有峰，为柱中杂质，UV峰会原来越小）。

1. A冲平后，A再冲洗一会60ml左右，冲洗盐离子浓度（Cond.）＜2.1，设置UV=0，双击auyozerdUV，执行。此时可用A 相稀释5-10倍的蛋白。
2. 上样。Pause暂停机器，将 A 泵放入盛有经 A 相稀释10倍(稀释至盐浓度4以下或与上样前盐浓度一至)的蛋白样品的烧杯中，然后点击继续（Continue项），直至样品上完并将 A 泵转移至 A 相中，上样最后时，可再加A液稀释部分，将烧杯倾斜，盯着上样，可弃最后一点样品，注意不要进入气泡。
3. 纯水冲洗A泵头，放入A液，设置0% 的 B ，用A 相冲洗约 50 - 100 mL ，使 UV 基线水平。
4. 设置conc trget 100，length 60 ，执行。
5. 装管，出液口对准第一管。
6. 设置程序。Manual — Frac —Peak\_FracParameters UV（第二个），选 Level 设置成20 mAU**（根据蛋白确定，设置需要有信号跳跃，即设置的mAU应高于当前显示的UV值**），执行。点击 Insert — Peak\_Fraction\_900（倒数第二个），设置收集量 1.mL，执行。（若设置有误，可Manual — Fractionation00，全部收集），**此时可开始冲分子筛的柱子**。
7. 收集结束后，Manual — Frac —Peak\_Fracstop900，执行。（不再收集）
8. AB相交替10 mL 洗脱 Q 柱，先 0% 的 B，再 100% 的 B，冲洗柱子到UV＜50或基线基本水平。
9. 暂停仪器，清水冲洗泵头，放入纯水（当天取）中继续冲洗，A走过约60ml，冲洗盐离子浓度（Cond.）＜2.1。
10. 若柱子长时间不用用dd水封存。
11. 收集峰尖前后的样品管。
12. 拆卸，先下后上拆卸柱子，注意不要引进气泡

9、超滤

根据纯化蛋白的分子量，选择合适的超滤管（一般会选择1/3目标蛋白分子量的超滤装置规格进行使用；理论上截留目标物，孔径应选 1/3 ~1/5 的膜；透过目标物，孔径应选5-10倍的膜）；

1. 新管初次使用需要平衡，超滤管中加满 ddH2O，5800 rpm 离心 5 min（不用全部离完，没完的倒掉即可）；
2. 加样 。样品加至滤膜上，2个配平，4℃，5800 rpm 离心浓缩至1ml。（脱盐柱上样 2.5 mL，分子筛上样 1 mL，分子筛可离心到0.5- 1 mL ，离心至1.5ml左右时，用离心下的液体，200 μL 的移液器吹吸一下滤膜；继续离心至1ml，第一次不确定可先短暂离几分钟。
3. Bradford 检测离心下的液体，看超滤管是否漏。
4. 4℃，13000rpm离心 10-15 min，弃沉淀；准备上样
5. 清洗（来不及可第二天清洗），0.2M NaOH（ 5800-6000 rpm 离心 10 min，再用水离心，若太脏不好清洗可先用NaOH浸泡）
6. 内外套管加 ddH2O 封存，以备下一次使用。
7. 跑胶，选择含目的蛋白的管超滤

10、分子筛。分子筛buffer（200 mM NaCl, 20 mM Tris即1L：10ml 1M Tris+25ml 4M NaCl）

1. 分子筛 Buffer 抽滤，接入 A 泵；
2. 装柱，待液体流出后先装柱上部（先不要上紧，否则超压，等下部打开后在拧紧上部），等液体流出后再装柱下部，装好后观察是否漏液；
3. 平衡，先保存本次实验，设置限压 1.3 MPa，流速 ＜0.5 mL/min, 用 A 泵（0%B）冲洗柱子直至盐离子浓度到达 9 以上，表示柱子平衡完毕（平衡柱子要提前 1.5 h 进行）；
4. 冲洗上样环，采用与上样体积一致的上样环，连接在仪器上，使用 2 mL 注射器用分子筛 Buffer冲洗 5 遍，注意不要有气泡，先去除针管内的液体气泡再冲洗；上样管处用废液桶接住，每次冲洗不要把注射器内液体全部打完，避免产生气泡。最后一次冲洗，针筒内留1ml液体，上样管下接buffer，用针筒往回抽，看有无气泡。
5. 验漏：Load 改为 Inject，若压力变化较大，可能上样环漏，需要重新安装，Inject改为Load，重新冲洗上样环，
6. 上样，上样管下端插入样品内，用针筒十分缓慢的抽取，直至全部抽完，样在上样管上端部分即可。
7. Load 改为 Inject，UV调为0，直到上样量超过 1mL（走到了 1.5 mL，超过之后会显示 mAU值）；
8. 设置参数，Insert —Peak\_FracParameters UV，选 Level 设置成 5 mAU（根据纯化蛋白适当调整）。点击 Insert — Peak\_Fraction\_900，设置收集量 0.5 mL，执行。
9. 样品峰出后，用水冲出盐峰（cond）平后即结束
10. 洗柱，先用分子筛 Buffer将盐离子浓度冲到 9 ，然后用 ddH2O 冲平即可（大约 1 h），若不常用再用20％酒精保存。

11、跑蛋白胶。

（1）蛋白胶是购买的成品，在4°冰箱。制胶撕掉底部的封条才可以使用，大小胶的上样量有差别，大孔 20 μL，小孔 10 μL，胶架封条滑面朝外，对好预制胶，不要装反。

* 1. Loading Buffer 5 μL +10蛋白 μL 充分混合；
  2. 沸水煮 2-3 min；
  3. 短暂离心
  4. 加样，点marker
  5. 缓冲液（缓冲液一包加 ddH2O 溶解至 1 L）加至没过预制胶底部
  6. 180 V， 跑 45min（，蛋白越大，跑的时间越长）；
  7. 启开塑料封装的胶块，加染色Buffer没过胶体，水平摇床 15 min；
  8. ddH2O 脱色，拍照留存。

12、点晶体