



实验 2.1

大肠杆菌表达的**GFP**的超声抽提、盐析与透析

❖ 一、实验内容

❖ 使用超声破碎法抽提蛋白

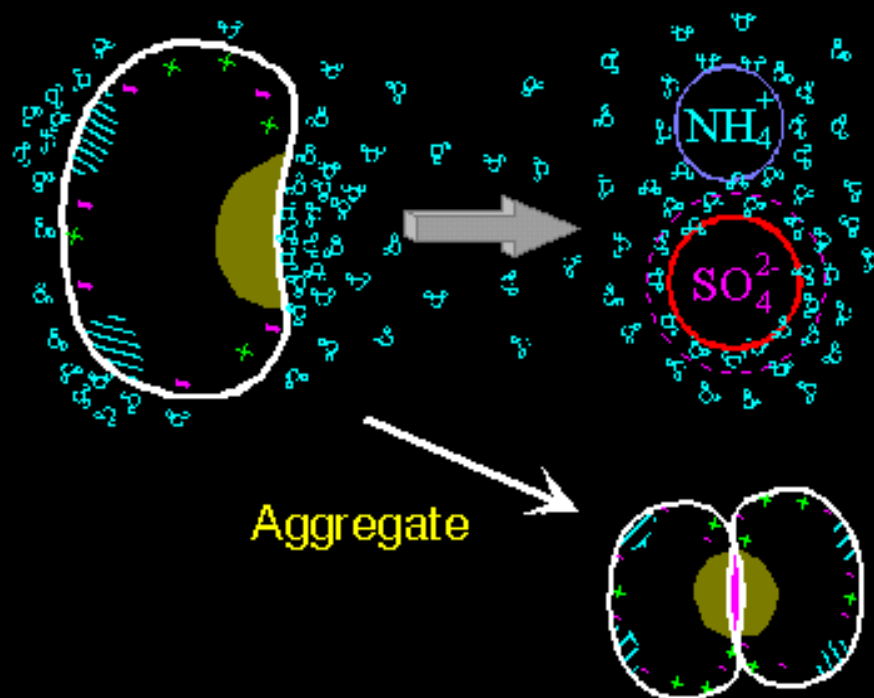
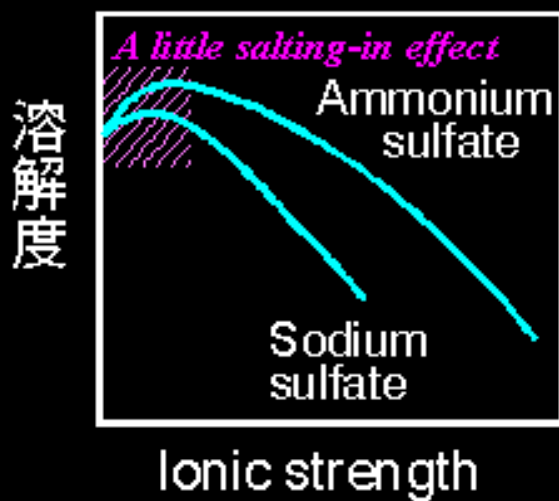
❖ 使用硫酸铵盐析沉淀蛋白

❖ 透析、浓缩

二、实验原理

盐析

Salting-out:



分级沉淀

由于各种蛋白质分子颗粒大小、亲水程度不同，故盐析所需的盐浓度也不一样，因此调节混合蛋白质溶液中的中性盐浓度可使各种蛋白质分段沉淀，从而实现蛋白质分离的目的。

三、实验材料

❖ (一) pGLO/ HB101 诱导培养物

❖ (二) 试剂

❖ 1、细菌蛋白抽提液

❖ 5.85g/L NaCl, 2.92g /L EDTA(乙二胺四乙酸), pH 8.0

❖ 2、饱和硫酸铵溶液

❖ (三) 仪器设备

❖ 台式高速离心机(50mL离心管)

❖ 超声波破碎仪

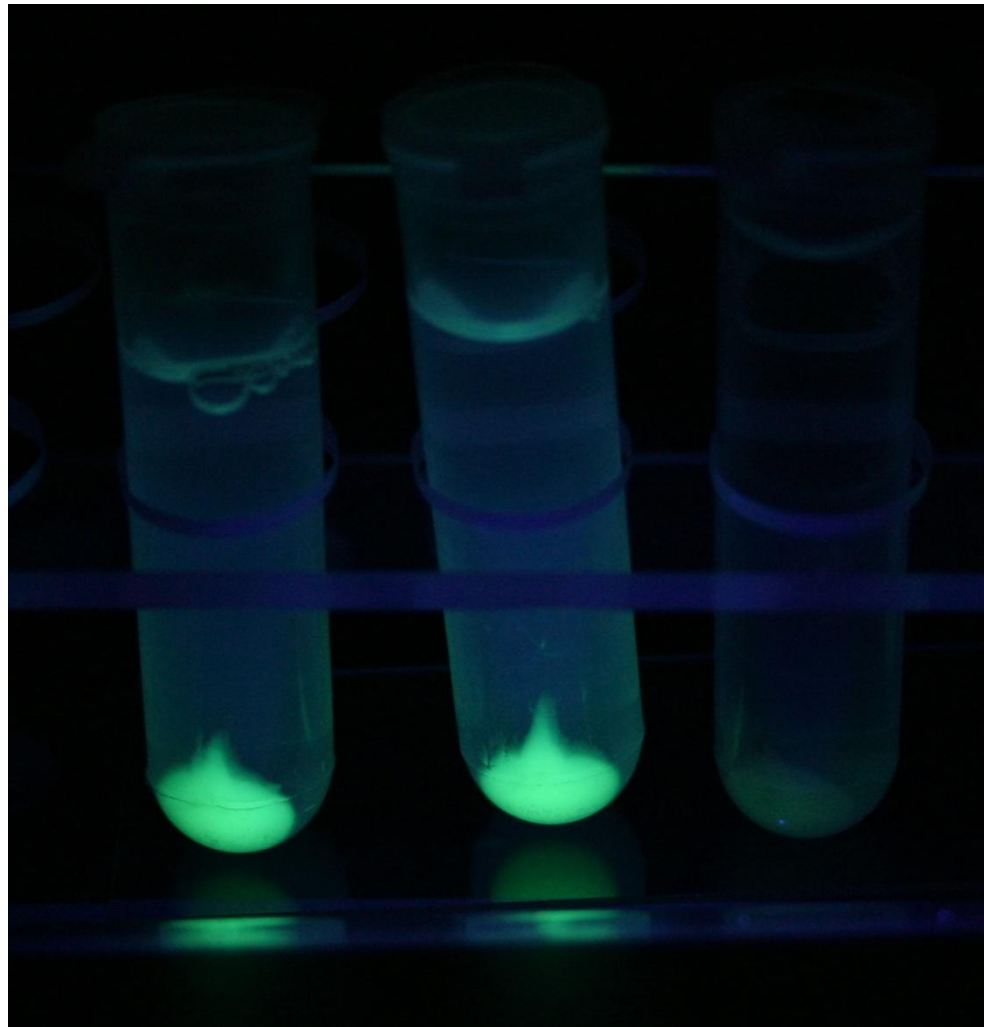


四、实验步骤

- ❖ (一)大肠杆菌的诱导培养
- ❖ (二)超声破碎抽提
- ❖ 1、 每人取诱导培养液，转移到50mL离心管中，4000r/min，10min离心收集菌体，至压积约5mL.
- ❖ **注意：取沉淀**
- ❖ 2、按30mL/5mL（菌体）的比例加入细菌蛋白抽提液，混匀
- ❖ 3、超声破碎：400W，10s，20s 循环10次，3组处理
- ❖ **注意：1)超声抽提时，每一组处理后间歇再操作!!**
- ❖ **2)冰浴中进行**
- ❖ 4、离心：4000r/min，10min
- ❖ **注意：取上清液，观察绿色荧光**

四、实验步骤

- ❖ (三)硫酸铵沉淀
- ❖ 1、在上清液中，加入等体积的饱和硫酸铵溶液，混匀。
- ❖ 2、将混合液离心：4000r/min，10min，观察现象，用验钞灯观察绿色荧光。
- ❖ 3、取含绿色荧光部分，加入等体积的饱和硫酸铵溶液，混匀。
- ❖ 4、将混合液离心：4000r/min，10min，观察现象，用验钞灯观察绿色荧光。保留绿色荧光部分，即为**GFP**粗品。



四、实验步骤

❖ (四)透析与浓缩

- ❖ 将上述所得沉淀用5mL 水溶解。置于约15cm长的透析袋（截留分子质量为12kD）（使用足够长的透析袋，以便加样后袋内留有足够的空间，大约是整袋的一半）中，排除溶液上部的空气，用绳扎紧袋的另一端。
- ❖ 然后将透析袋放入800mL水中透析过夜脱盐（磁力搅拌）。中间多次换液。
- ❖ 浓缩：取出透析袋，放到烧杯中，用聚乙二醇6000将透析袋覆盖上，吸水浓缩至体积约为0.3mL。

实验注意事项

- ❖ 1、新透析袋用沸水煮五至十分钟，再用蒸馏水洗净，即可使用。
- ❖ 2、使用时，一端用橡皮筋或线绳扎紧，也可以使用特制的透析袋夹夹紧，由另一端灌满水，用手指稍加压，检查不漏，方可装入待透析液，通常要留三分之一至一半的空间，以防透析过程中，透析的小分子量较大时，袋外的水和缓冲液过量进入袋内将袋涨破。含盐量很高的蛋白质溶液透析过夜时，体积增加50%是正常的。为了加快透析速度，除多次更换透析液外，还可使用磁子搅拌。透析的容器要大一些，可以使用大烧杯、大量筒和塑料桶。

硫酸铵沉淀实验记录与分析讨论

实验步骤	实验结果记录	分析讨论
1、取超声破碎液，用验钞灯观察绿色荧光。		
2、将破碎液离心： 4000r/min，10min，取上清。观察绿色荧光。		
3、在上清液中，加入等体积的饱和硫酸铵溶液，混匀。将混合液离心：4000r/min，10min，观察现象，用验钞灯观察绿色荧光。		
4、取含绿色荧光部分，加入等体积的饱和硫酸铵溶液，混匀。将混合液离心：4000r/min，10min，观察现象，用验钞灯观察绿色荧光。保留绿色荧光部分，即为GFP粗品。		