

Anti-his 芯片使用操作规程

1 实验目的

通过氨基偶联在 C5 芯片上制备 anti-his 表面，用来捕获 his tag 蛋白作为配体，供后续分析使用。

2 耗材与试剂

2.1 实验耗材

C5 芯片 1 块

2.2 实验试剂

氨基偶联试剂盒 1 份、预偶联试剂盒 1 份、Anti-his 40 μ g

3 实验操作

Running buffer 用 1X PBS-T 或 1X HBS-T 均可。

3.1 C5 芯片初始化

C5 芯片用 50mM NaOH 进行 condition，30 μ L/min 流速，AB 通道，进样 60s，共进行 3 次。洗去芯片表面保护剂后再进行后续实验。

3.2 Anti-his 氨基偶联

① 活化芯片表面羧基

EDC (75mg/mL) 与 NHS (11.5mg/mL) 等体积混合，10 μ L/min，AB 通道，进样 420s。

注意：活化试剂极易水解失效，请现配现用或冷冻分装后即时化冻使用，且混合后 15min 内上机使用。

② 氨基偶联 anti-his

用 pH 4.5 的醋酸钠溶液稀释 Anti-his 至 10 μ g/mL, 10 μ L/min, AB 通道, 进样 600s.

③ 封闭芯片表面位点

用乙醇胺 (EA) 封闭芯片表面的多余活化羧基位点, 10 μ L/min, AB 通道, 进样 420s.

3.3 Anti-his 芯片的使用注意事项

- ① Anti-his 芯片捕获 his tag 蛋白, 稳定捕获量~3000RU。Glycine 1.5, 10 μ L/min, AB 通道, 进样 30s.可作为 anti-his 芯片的常规再生条件。
- ② Anti-his 芯片捕获 his tag 的稳定性受 tag 的暴露程度、自身构象所影响。部分 his tag 蛋白捕获后有基线下滑 (捕获不牢) 的情况, 当下滑速度 (RU/min) * 互动时间 (min) \geq 20%捕获量 (RU) 时, 不建议使用 anti-his 方案, 建议尝试其他捕获方案或偶联法固定配体。
- ③ Anti-his 制备完成后, 其捕获活性受保存条件影响较大, 不建议半湿法后二次使用。