



MBP标签蛋白纯化试剂盒 (pH 7.4)

产品介绍

Dextrin 亲和层析树脂是一种将糊精键合在琼脂糖基球上形成的亲和层析分离介质。糊精配基可与麦芽糖结合蛋白(MBP)特异性结合,因而可纯化带 MBP 标签的融合蛋白。本产品可在接近生理条件下纯化目标蛋白,可最大程度保留目标蛋白的活性。MBP 标签较大,分子量约为 42 kDa。MBP 标签的主要作用有促进目标蛋白正确折叠,增加蛋白的表达水平,提高目标蛋白的可溶性。同时带 MBP 标签的融合蛋白特定的亲和填料,MBP 标签在大肠杆菌体系中经常使用,亲和层析后通常利用特异性酶去除标签。该树脂实际凝胶每毫升可承载 3-5 mg MBP 融合蛋白。Dextrin Resin 凝胶的颗粒直径为45-165 μm ,可耐受的最大压力为 0.3 MPa , Dextrin 亲和层析树脂储存在 20%乙醇中,凝胶和保护液的体积比为 1:1 , 10 mL 总体积中 5 mL 为凝胶、5mL 为液体。使用时宜把凝胶充分重悬后再吸取。

产品特点

1. 快速、高效: 本试剂盒使用了 MBP 标签蛋白纯化树脂,挂柱效率高,缩短操作时间的同时可以有效的避免在长时间操作过程中目的蛋白的降解或变性,充分保证目的蛋白的活性。
2. 便捷: 提供了 MBP 标签蛋白纯化时所需的相关试剂和亲和层析柱空柱管,为 MBP 标签蛋白的纯化带来了极大的便利。
3. 特异性强: 糊精配基可与麦芽糖结合蛋白(MBP)特异性结合,可进一步纯化。
4. 不影响蛋白活性: 采用麦芽糖温和洗脱,无去污剂和变性剂对蛋白活性的影响。

产品组份

R46105	组份	10T	储存	单次测试使用量
R46105A	Dextrin 亲和层析树脂	10 mL	2-8°C, 禁止冷冻	1 mL



R46105B	裂解缓冲液	180 mL	2-8°C	18 mL
R46105C	洗杂缓冲液	100 mL	2-8°C	10 mL
R46105D	洗脱缓冲液	100 mL	2-8°C	10 mL
R46105E	麦芽糖	360 mg	室温	36 mg
R46105F	层析空柱, 3 mL (盖, 塞, 膜)	10 EA	室温	1 EA

使用方法

一、样品准备

1、细菌或酵母表达的可溶性蛋白

(1) 挑取单菌落到含有适合抗性的培养基中, 根据载体使用说明, 加入相应浓度的诱导剂诱导相应的时间。

(2) 表达结束后, 将培养液转移到离心瓶中, 7000 rpm (7500 ×g), 离心 15 min 收集菌体, 然后按照菌体与裂解液比例为 1 : 10 (W/V) 加入裂解液, 根据蛋白易降解性质可选择性加入终浓度为 1 mM 的 PMSF, 也可加入其他蛋白酶抑制剂, 但不能影响目的蛋白与填料的结合。根据需求可加入溶菌酶(如果表达的宿主细胞内含 pLysS 或 pLysE, 可以不加溶菌酶)。

(3) 将菌体沉淀悬浮起来(如果菌液浓度高, 也可考虑加入 10 µg/mL RNaseA 和 5 µg/mL DNaseI), 混匀, 放置于冰上, 然后冰水混合物上超声破碎细胞, 至菌液基本保持澄清。

(4) 将澄清的破碎液转移至离心管中, 10000 rpm (15000 ×g), 4°C 离心 20-30 min。取上清, 置于冰上备用, 进行下一步纯化。

2、酵母、昆虫和哺乳细胞分泌表达可溶性蛋白

将细胞培养液转移至离心瓶, 5000 rpm (3800 ×g), 离心 10 min, 收集上清, 可直接上柱使用。对于大量体积的上清, 需加入硫酸铵沉淀浓缩后, 蛋白还需用平衡液透析后才能加入柱子。

二、缓冲液的准备



含麦芽糖洗脱缓冲液的配制: 洗脱缓冲液不含麦芽糖, 添加 360 mg 麦芽糖至 100 mL 洗脱缓冲液中, 以配制含 10 mM 麦芽糖洗脱缓冲液, 配制完后可用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤器过滤, 并将溶液保存在 2-8°C。可根据实验使用量配制, 宜现配现用。

三、样品纯化

样品在上样前建议离心或用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤, 减少杂质, 提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。缓冲液在使用前最好用 0.22 μm 或者 0.45 μm 滤膜过滤。

A. 重力柱法纯化

1、重力柱的装填

- (1) 取层析空柱, 装入下垫片, 加入适量纯水润洗柱管和垫片, 关闭下出口。
- (2) 将 Dextrin 亲和树脂充分混匀, 用移液器吸取适量浆液加入重力柱中(填料实际体积占悬液的一半, 如吸取 1 mL 悬液, 其实际体积为 0.5 mL, 则最大载量约为 2.5 mg), 打开下出口流干保护液。
- (3) 加入适量纯水冲洗填料, 待柱管中液体重力流干后, 关闭下出口。
- (4) 加入润洗后的上垫片, 确保垫片与填料之间没有空隙, 且保持水平。
- (5) 装填好的重力柱可以直接加入 Lysis Buffer/Wash Buffer 进行平衡, 暂不使用时则加入保护液, 4°C 保存。

2、平衡

将装填好 Dextrin 亲和层析树脂的重力柱用 2-5 CV(CV 是指沉降后的树脂体积, 以下内容提到的 CV 不再做此注解)裂解缓冲液或洗杂缓冲液进行平衡, 重复2-3 次。

3、上样

将样品加到平衡好的重力柱中, 样品缓慢流出, 保证样品和填料充分接触, 收集流出液, 可以反复上样增加结合效率 (如果目标蛋白不稳定, 建议样品置于冰上)。

4、洗杂



使用 5-10 CV 的洗杂缓冲液洗涤柱子，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液。洗柱及下一步洗脱过程中可以用 Bradford 法简单快速地检测每次洗涤液和洗脱液中的蛋白含量，从而考虑增加或减少洗涤和洗脱的次数。

5、洗脱

使用 5-10 CV 的含麦芽糖洗脱缓冲液洗脱目的蛋白。分段收集，每 1-5 个 CV 收集一管，分别检测，既可以保证所有结合的目的蛋白被洗脱，又可以得到高纯度和高浓度的蛋白。

B. 孵育法纯化

1、树脂准备

根据纯化的样品量，取适量 Dextrin 亲和层析树脂加入离心管中，1000 rpm 离心 1 min，小心的吸弃上清(保持低速离心，以免损坏树脂)；也可加入重力柱中，流干保护液。

2、平衡

向离心管中加入 5 CV 裂解缓冲液或洗杂缓冲液，轻柔上下翻动混匀，1000 rpm 离心 1 min 后，小心的去除上清；如使用重力柱，则直接在重力柱中清洗，直接重力流干洗杂液；重复两次以上。

3、树脂结合目的蛋白

将准备好的样品加入到平衡好的树脂中，封闭离心管或重力柱管，旋转振荡孵育，室温 30 min-2 h 或 2-8℃ 2-4 h，可适当延长时间，使混合液与树脂充分混匀(如果目标蛋白不稳定，建议置于 2-8℃ 环境中结合)。1000 rpm 离心 1 min 后，小心的吸出上清，将上清留存进行检测分析。

4、洗杂

使用 5 CV 的洗杂缓冲液洗涤柱子，轻柔上下翻动混匀，1000 rpm 离心 1 min 后，小心的吸出上清，将上清留存进行检测分析。重复 3-5 次。如使用重力柱，则直接在重力柱中清洗，直接重力流干洗杂液。

5、洗脱



加入 3-5 CV 的含麦芽糖洗脱缓冲液进行洗脱，室温孵育 5min，1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管收集洗脱液，可重复 2-3 次。

上述步骤洗脱结束后，用洗杂液冲洗 3 CV，然后用纯水冲洗 5 CV，再用保护液冲洗 2 CV，然后将树脂置于 2-8°C 保存。

四、样品检测与填料清洗

1、SDS-PAGE 检测

将纯化过程中得到的样品 (包括原始样品、流出组分、洗杂及洗脱组分等) 利用 SDS-PAGE 进行检测，判定其纯化效果。

2、填料清洗

洗脱目的蛋白后的柱子用纯水清洗 3-5 个柱体积，并用 0.5 M NaOH 再生 3-5 个柱体积，再用纯水清洗至中性，用 20% 乙醇保存柱子，或用结合缓冲液平衡后进行下一次纯化，建议流速为 75~150 cm/h。

注意事项

1. 请勿冷冻保存 Dextrin 亲和层析树脂；
2. Dextrin 亲和层析树脂储存在含 20% 乙醇中，凝胶和保护液的体积比为 1:1；
3. Dextrin 亲和层析树脂使用前一定要充分颠倒若干次，使琼脂糖珠混合均匀；
4. 本产品仅作科研用途；
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。