

## MBP 标签亲和填料 (麦芽糖结合蛋白)

产品货号: M1050

储存条件: 2-8 °C

## 产品简介

MBP标签亲和填料是一种纯化带有麦芽糖结合蛋白(MBP) 标签蛋白的亲层析介质, 具体性能见表 1。MBP 可促进连接蛋白的正确折叠, 增加在细菌中过量表达的融合蛋白的溶解性, 尤其是真核蛋白。MBP标签亲和填料可以一步纯化 MBP 融合蛋白, 结合的融合蛋白可以用 10 mM 麦芽糖进行温和洗脱, 保护了标签蛋白的活性。如果要去除 MBP 融合部分可用位点特异性蛋白酶切除。

表 1 MBP标签亲和填料产品性能

项目	性能
基质	高度交联的 6%琼脂糖微球
配体	糊精
载量	>10 mg MBP 蛋白(80 kDa) /ml 介质
微球粒径	45-165 μm
最大压力	0.3 MPa, 3 bar
pH 稳定范围	3-12
储存缓冲液	含 20%乙醇的 1xPBS
储存温度	2-8 °C

## 纯化流程

## 1. 缓冲液的准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤。

平衡/洗杂液: 20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH7.4

洗脱液: 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 10 mM 麦芽糖, pH7.4

注意: 平衡液和洗脱液中可加入 1 mM DTT 或 10 mM β-巯基乙醇

## 2. 样品准备

样品在上样前建议离心或用 0.22μm 或 0.45μm 滤膜过滤, 减少杂质, 提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

## 3 MBP标签亲和填料装填

## 3.1 重力柱的装填

- 1) 取合适规格的重力层析柱, 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 Beads 6FF 混合均匀, 用枪头吸取适量浆液加入至重力柱中(介质实际体积占悬液的一半), 打开下出口流干保护液。
- 3) 加入适量纯水冲洗介质, 待柱管中液体重力流干后, 关闭下出口。
- 4) 装入润洗后的上垫片, 确保垫片与填料之前没有空隙, 且保持水平。

5) 装填好的重力柱可以直接加入平衡液进行平衡, 暂不使用时则加入保护液, 2-8°C保存。

### 3.2 中压层析柱的装填

MBP标签亲和填料被广泛应用于工业纯化, 因此, 涉及到各种中压色谱层析柱的装填, 下面介绍装填层析柱的方法。装柱前根据层析柱直径计算柱子底面积, 根据所需装柱高度计算所需介质体积, 公式如下:

$$V = 1.15\pi r^2 h \quad (V: \text{所需介质体积 ml}; 1.15: \text{压缩系数}; r: \text{柱管半径 cm}; h: \text{装填高度 cm})$$

**注意: 所取悬液体积应为介质体积的两倍, 因为介质体积只占悬液总体积的一半, 另一半为保护液。**

- 1) 用去离子水冲洗层析柱底筛板与接头, 确保柱底筛板上无气泡, 关闭柱底出口, 并在柱底部留 1-2 cm 的去离子水。
- 2) 将介质悬浮起来, 小心的将浆液连续地倒入层析柱中。用玻璃棒沿着柱壁倒入浆液可减少气泡的产生。
- 3) 如果使用储液器, 应立即在层析柱和储液器中加满水, 将进样分配器放置于浆液表面, 连接至泵上, 避免在分配器或进样管中产生气泡。
- 4) 打开层析柱底部出口, 开启泵, 使其在设定的流速下进行。最初应让缓冲液缓慢流过层析柱, 然后缓慢增加至最终流速, 这样可避免液压对所形成柱床的冲击, 也可以避免柱床形成的不均匀。如果达不到推荐的压力或流速, 可以用所使用泵的最大流速, 这样也可以得到一个很好的装填效果。(注意: 在随后的色谱程序中, 不要超过最大装柱流速的 75%) 当柱床高度稳定后, 在最后的装柱流速下至少再上 3 倍柱床体积的去离子水。标上柱床高度。
- 5) 关闭泵, 关闭层析柱出口。
- 6) 如果使用储液器, 去除储液器, 将分配器置于层析柱中。
- 7) 将分配器推向柱子至标记的柱床高度处。允许装柱液进入分配器, 锁紧分配器接头。
- 8) 将装填好的层析柱连接至泵或色谱系统中, 开始平衡。如果需要可以重新调整分配器。

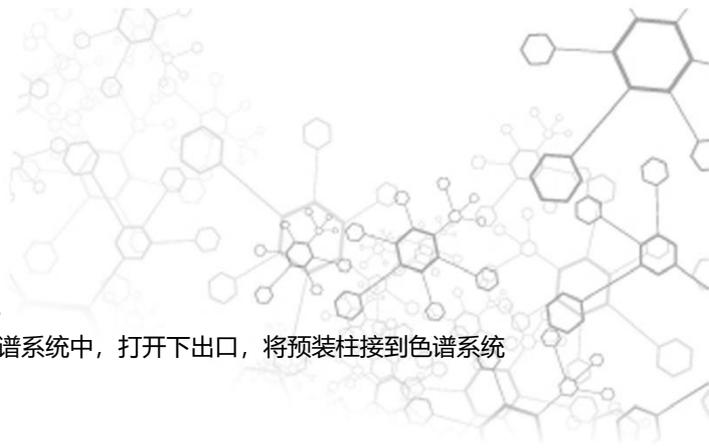
## 4. 样品纯化流程

### 4.1 孵育法纯化

- 1) 根据纯化样品量, 取适量 MBP 标签亲和填料加入离心管中, 1000rpm 离心 1min, 吸弃上清; 也可加入重力柱中, 流干保护液。
- 2) 向离心管中加入 5 倍介质体积的平衡液清洗介质, 1000rpm 离心 1 min, 吸弃上清; 如使用重力柱, 则直接在重力柱中清洗, 直接重力流干平衡液; 重复两次以上。
- 3) 加入样品, 封闭离心管或重力柱管, 4°C 振荡孵育 2-4h 或者 37°C 孵育 30 min-2h。
- 4) 孵育结束后, 1000 rpm 离心 1 min, 吸弃上清, 或过滤收集介质, 上清保留作为流穿, 用于电泳鉴定。
- 5) 用 5 倍介质体积的洗杂液清洗介质, 1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管过滤, 去除上清 (注意不要吸到介质), 重复 3-5 次, 中间建议更换新离心管。
- 6) 加入 3-5 倍柱体积的洗脱液进行洗脱, 室温孵育 10-15 min, 1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管收集洗脱液, 可重复 2-3 次。

### 4.2 重力柱法纯化

- 1) 将装填好的 MBP 标签亲和填料重力柱用 5 倍柱体积平衡液进行平衡, 使填料处于与目的蛋白相同的缓冲液体系下, 重复 2-3 次。
- 2) 将样品加到平衡好的重力柱中, 样品保留时间至少 2 min, 保证样品和介质充分接触, 收集流出液, 可以反复上样增加结合效率。
- 3) 用 10-15 倍柱体积的洗杂液进行洗杂, 去除非特异性吸附的杂蛋白, 收集洗杂液。
- 4) 使用 5-10 倍柱体积的洗脱液洗脱, 分段收集, 每一个柱体积收集一管, 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。



#### 4.3 中压层析柱法纯化

MBP标签亲和填料装填好后，可以用各种常规的中低压色谱系统。

- 1) 将泵管道中注满去离子水。去掉上塞子，将层析柱连接至色谱系统中，打开下出口，将预装柱接到色谱系统中，并旋紧。
- 2) 用 3-5 倍柱体积的去离子水冲洗出储存缓冲液。
- 3) 使用至少 5 倍柱床体积的平衡液平衡色谱柱。
- 4) 利用泵或样品环上样。

**注:**样品的粘度增加使得即使上样体积很少，也会导致层析柱很大的反压。上样量不要超过柱子的结合能力。大量的样品体积也可能造成很大的反压，使得进样器更难使用。

- 5) 用洗杂液冲洗柱子，直到紫外吸收达到一个稳定的基线（一般至少 10-15 个柱体积）。
- 6) 使用 5-10 倍柱体积的洗脱液洗脱，收集洗脱液，即目的蛋白组分。

上述步骤洗脱结束后，用平衡液冲洗 3 倍柱体积，然后用纯水冲洗 5 倍柱体积，再用保护液冲洗 2 个柱体积，然后将介质置于 2-8°C 保存。

#### 5. SDS-PAGE 检测

将使用纯化产品得到的样品（包括流出组分、洗杂组分和洗脱组分）以及原始样品使用 SDS-PAGE 检测纯化效果。

#### 6. 填料清洗

MBP标签亲和填料纯化产品可以重复使用而无需再生，但随着非特异性结合的蛋白的增多和蛋白的聚集，往往造成流速和结合载量都下降，这时可按照下面方法对填料进行清洗。

- 1) 3 倍柱体积的去离子水;
- 2) 3 倍柱体积的 0.1% SDS 或 0.1 M NaOH 溶液;
- 3) 3 倍柱体积去离子水，20%乙醇 2-8°C保存。