

MBP标签蛋白纯化试剂盒

产品货号: M1051

储存条件: 4°C 保存

产品组分

货号	组分	规格
M1050	Dextrin Beads 6FF	5ml
M1051B	裂解缓冲液	100ml
M1051C	漂洗缓冲液	100ml
M1051D	洗脱缓冲液	50ml
AC003	3ml AC 层析柱	10套

注: 洗脱液不含麦芽糖, 需额外添加 0.18g 麦芽糖至 M1051D 中, 以配置 10mM 的洗脱液, 配置完后可用 0.22 μ m 或者 0.45 μ m 滤器过滤, 并将溶液保存在 4°C

产品简介

MBP 标签蛋白纯化试剂盒用于纯化带有麦芽糖结合蛋白(MBP)标签蛋白。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。Dextrin Beads 6FF 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。

注意事项:

- 1、试剂盒中的 Dextrin Beads 6FF 体积 5ml 为 beads 体积, 总体积 10ml (保护液为 20%乙醇溶液) 使用前需要充分混合均匀;
- 2、请勿在 -20°C 或更低温度冷冻保存 Dextrin Beads 6FF。
- 3、若离心不能完全除去蛋白样品中的不溶物, 可以将样品溶液用 0.45 μ m 的滤膜过滤。
- 4、若使用本说明书提供的条件无法达到理想的纯化效果, 可尝试改变洗杂液和洗脱液中的 pH, 以达到最优效果。
- 5、M1051D 组分需额外添加 0.18g 麦芽糖配置后使用。
- 6、菌液生长期间可添加 0.2% 的葡萄糖, 以抑制淀粉酶的表达。
- 7、请穿实验服戴一次性手套操作。

实验步骤

使用说明:

如下以大肠杆菌中表达纯化 MBP 标签蛋白为例, 说明本产品的使用方法。在其它体系中表达时, 请参考该表达体系的相关使用说明, 并借鉴大肠杆菌中纯化 MBP 标签蛋白的使用说明。

1. 大肠杆菌中可溶性 MBP 标签蛋白的诱导表达

如下以最常用的 IPTG 诱导表达系统给予说明, 诱导表达条件的优化请参照所使用的诱导表达体系的详细说明。其它诱导表达系统请参考适当的使用说明进行。

- a. 挑取表达 MBP 标签蛋白的单克隆, 接种到 3ml 或 10-20ml 含适当抗生素的 LB 培养液中, 37°C 培养过夜。
- b. 按照 1:20 的比例取培养过夜的菌液, 接种到预热至 37°C 并含适当抗生素的 LB 培养液中。例如取 5ml 培养过夜的菌液接种到 100ml 预热至 37°C 并含适当抗生素的 LB 培养液中。具体的培养体积视需要纯化的蛋白量而定, 初步的鉴定培养 3-10ml 即可; 常规的表达纯化, 通常可考虑培养 100-200ml; 制备型的纯化, 培养体积可以达到 1L 或更大。如果希望取得更好的表达效果, 建议按照 1:100 的比例接种过夜培养的菌液, 但后续培养至相应的 OD 值需要更长的时间。
- c. 37°C 常规培养约 30-60min 或更长时间, 至菌液的 OD₆₀₀ 达到 0.6-1.0。
- d. 加入 IPTG 至终浓度为 1mM, 37°C 诱导表达 2-4 小时。

注: 可以在加入 IPTG 前取出少量菌液同样培养 2-4 小时后作为未诱导的对照, 也可以在加入 IPTG 前直接取出少量菌液作为未诱导的对照。对于特定蛋白的诱导表达, 最佳的 IPTG 浓度、诱导温度、和诱导时间需要通过实验确定。

同时为抑制淀粉酶可在培养菌液期间添加 0.2% 的葡萄糖。

- e. 收集菌液至离心管中, 4°C 4,000g 离心 20 分钟或 4°C 15,000g 离心 1 分钟, 弃上清, 收集沉淀。随后即可进入细菌裂解步骤, 也可以在 -20°C 或 -80°C 冻存备用。冷冻保存的菌体使用前需置于冰上解冻 15 分钟。

2. MBP 标签蛋白的小量纯化

本方法常用于小量样品的快速分析和鉴定, 为后续大量制备打下基础。

- a. 按步骤 1(e), 离心收集 1ml 菌液的细菌沉淀并弃上清, 加入 100 μ l 裂解缓冲液, 将细菌沉淀充分重悬于裂解缓冲液中, 可进行轻微的涡旋振荡(尽量避免产生气泡)。

注: 根据 MBP 标签蛋白表达的丰度, 菌液和裂解缓冲液的体积比可以在 25:1-5:1 范围内适当调整。表达丰度非常高时, 每毫升菌液沉淀可



以加入 200 μ l 裂解缓冲液；表达丰度非常低时，每毫升菌液沉淀可以加入 40 μ l 裂解缓冲液。

如有必要，在裂解细菌之前，可以在裂解液中添加适量的蛋白酶抑制剂混合物。

b. 轻轻 vortex 数下，以充分裂解细菌，尽量避免产生气泡。

c. 4 $^{\circ}$ C 离心(15000g \times 10min)，取 10 μ l 上清留样作后续检测用，收集余下上清至一新的洁净离心管中。

注：本步骤及后续步骤收集的上清必须保持澄清，即不含任何不溶物。

上清中如果混有不溶性杂质会严重影响后续纯化获得蛋白的纯度。

d. 加入 20 μ l 混合均匀的 Dextrin Beads 6FF，4 $^{\circ}$ C 在摇床上缓慢摇动 30min，以充分结合带 MBP 标签的目的蛋白。

注：缓慢摇动 30min 已经可以确保蛋白充分结合，但可以根据时间安排的需要缓慢摇动更长时间甚至缓慢摇动过夜。经测试，直接使用 Dextrin Beads 6FF 也能获得良好的纯化效果。但如果希望获得更高的标签蛋白得率，可以参考步骤 3e，用与凝胶等体积的裂解缓冲液平衡 Dextrin Beads 6FF 2-3 次。平衡后，待纯化蛋白的得率通常会有所提高。

e. 4 $^{\circ}$ C 离心(1000g \times 10s)沉淀凝胶，取 20 μ l 上清留样作后续检测用，其余上清弃去。

f. 加入 100 μ l 漂洗缓冲液重悬凝胶，4 $^{\circ}$ C 离心(1000g \times 10s)，取 20 μ l 上清留样作后续检测用，其余上清弃去。

g. 重复步骤 f，再进行一次洗涤。

注：如有需要，可根据具体情况使用酶切融合蛋白的 MBP 标签从而释放目的蛋白。详细的 MBP 标签酶切操作请参考步骤 4，MBP 标签的酶切去除。

h. 加入 20 μ l 洗脱缓冲液，轻轻重悬凝胶。4 $^{\circ}$ C 离心(1000g \times 10s)，收集上清及凝胶。上清即为纯化获得的带有 MBP 标签的目的蛋白。

i. 重复步骤 h 两次。共洗脱并收集约 60 μ l 纯化的蛋白样品。

3. MBP 标签蛋白的大量纯化

本方法适用于较大量(例如菌液体积在 50ml 及以上)蛋白样品的纯化。

a. 接步骤 1(e)，对于新鲜的或解冻的细菌沉淀，按照每克细菌沉淀湿重加入 4ml(2-5ml 均可)的比例加入裂解缓冲液，充分重悬菌体。如有必要，可以在裂解细菌之前，在裂解液中添加适量的蛋白酶抑制剂混合物。

b. 冰上超声裂解细菌。超声功率 200-300W，每次超声处理 10s，每次间隔 10s，共超声处理 6 次。

注：具体超声处理的方式须根据特定型号的超声仪器自行摸索和优化。

c. (可选做)如果超声处理后裂解液非常粘稠，可以加入 RNase A 至 10 μ g/ml 及 DNase I 至 5 μ g/ml，冰上放置 10-15min。或者也可以使用适当的装好了较细针头的注射器，反复抽吸数次，以剪切粘稠的基因组 DNA 等。

d. 4 $^{\circ}$ C 10,000g 离心 20-30min，收集细菌裂解液上清并置于冰水浴或冰上。可以取 20 μ l 上清留作后续检测用。

注：上清必须保持澄清，即不含任何不溶物，才能进行下一步的纯化。上清中如果混有不溶性杂质会严重影响后续纯化获得蛋白的纯度。

e. 取 1ml 混合均匀的 Dextrin Beads 6FF，4 $^{\circ}$ C 离心(1000g \times 10s)弃去储存液，向凝胶中加入 0.5ml 裂解缓冲液以重悬并平衡凝胶，4 $^{\circ}$ C 离心(1000g \times 10s)弃去液体，再重复平衡 1-2 次，弃去液体。将约 4ml 细菌裂解液上清加入其中，4 $^{\circ}$ C 在侧摆摇床或水平摇床上缓慢摇动 60min。

f. 将裂解液和 Dextrin Beads 6FF 的混合物装入本试剂盒提供的亲和层析柱空柱管(3ml)中。

注：也可先取 1ml 混合均匀的 50% Dextrin Beads 6FF 装柱，然后用 0.5ml 裂解缓冲液平衡 2-3 次后加入约 4ml 细菌裂解液上清，后续可以把流穿液收集后重复上柱 3-5 次以充分结合目的蛋白。先混合后装柱的方式操作起来相对麻烦一些，但更有利于 MBP 标签蛋白与填料的充分结合。

g. 将纯化柱底部的盖子打开，在重力作用下使柱内液体流出，收集约 20 微升流穿液作后续分析用。

h. 洗柱 5 次，每次加入 0.5-1ml 漂洗缓冲液，每次均收集约 20 微升穿柱的液体用于后续的分析检测用。洗柱及下一步洗脱过程中可以用 Bradford 法(B5105/6)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。

注：如果出现后续获得蛋白纯度不够高的情况，可以再增加洗柱次数 2-3 次。若有需要，也可以用酶切融合蛋白的 MBP 标签从而释放目的蛋白。详细的 MBP 标签酶切去除的方法请参考步骤 5，MBP 标签的酶切去除。

i. 洗脱目的蛋白 6-10 次，每次用 0.5ml 洗脱缓冲液。将每次的洗脱液分别收集到不同的离心管中。收集获得的洗脱液即为纯化的 MBP 标签蛋白样品。



4. 标签切除 (仅供参考, 最佳实验条件可根据情况进行调整摸索)

大多数情况下, 融合表达的 MBP 标签不会影响目的蛋白的活性, 可以用完整的融合蛋白进行活性检测。如果 MBP 标签可能影响目的蛋白的活性, 那么在构建质粒时可以在 MBP 标签和目的蛋白之间加入适当的蛋白酶的识别位点, 例如 PreScission Protease、TEV Protease 或 Thrombin 等的识别位点, 这样就可以在柱上(on column)或洗脱后用相应的蛋白酶切除 MBP 标签。

由于 PreScission Protease 能在 4°C 进行高效的酶切, 而 TEV Protease 或 Thrombin 的最佳酶切温度是室温而且耗时较长, 因此推荐在设计目的蛋白的 MBP 标签时, 添加 PreScission Protease 识别的酶切位点。使用 PreScission Protease 进行 MBP 标签的切除进行详细的说明如下:

a. 柱上酶切含 MBP 标签的融合蛋白(以 8mg MBP 标签蛋白/ml 凝胶为例)

(a) 在 MBP 标签蛋白结合于纯化柱(0.5ml)并用洗涤液充分洗涤后, 再用 5ml PreScission Protease 的酶切缓冲液平衡柱子。PreScission Protease 的酶切缓冲液的组分为 50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, pH7.5。

(b) 准备 PreScission Protease: 约每毫克 MBP 标签蛋白使用 20U PreScission Protease。对于 4mg MBP 标签蛋白需使用 80U PreScission Protease, 用 PreScission 酶切缓冲液稀释至与凝胶柱相同的体积, 即 0.5ml。

(c) 将稀释好的 0.5ml PreScission Protease 加入纯化柱中, 4°C 保持 4h(为确保酶切完全, 可以 4°C 酶切过夜)。如果蛋白结合是在离心管中进行的, 可将准备好的 PreScission Protease 直接加入离心管中, 4°C 在摇床上缓慢摇动 4 小时(为确保酶切完全, 可以 4°C 酶切过夜)。

(d) 用 0.5ml PreScission Protease 酶切缓冲液洗涤, 重复三次, 分别收集每次的洗涤液。如果酶切反应是在离心管中进行的, 1000g 离心 2 分钟, 收集上清, 然后加入 0.5ml 酶切缓冲液重新沉淀, 离心(1000g×2min)收集上清, 接着再加入 0.5ml 酶切缓冲液重新沉淀, 离心(1000g×2min)收集上清。洗脱组分中含有切除了 MBP 标签的目的蛋白, 而 MBP 标签和带有 MBP 标签的 PreScission Protease 则仍然结合在凝胶柱上。

b. 洗脱后酶切含 MBP 标签的融合蛋白(以 8mg MBP 标签蛋白/ml 凝胶为例)

(a) 使用脱盐柱快速除去洗脱组分中的麦芽糖, 或用 PreScission Protease 酶切缓冲液进行透析。

(b) 按每 100μg MBP 标签蛋白加入 2U PreScission Protease 的比例加入蛋白酶, 如果蛋白未定量, 可以按照每 0.5ml 凝胶加入 80U PreScission Protease (按照每毫升凝胶结合 8mg MBP 标签蛋白进行预估)的比例进行。4°C 孵育 4h。

(c) 将酶切后的蛋白样品加入预先用 PreScission Protease 酶切缓冲液平衡好的 Dextrin Beads 6FF, 室温结合 20-30 分钟。

(d) 500g 离心 5 分钟, 收集上清, 其中含有切除了 MBP 标签的目的蛋白, 没有消化的 MBP 标签蛋白和 PreScission Protease 则结合在凝胶沉淀中。

