天净沙系列

CAT#：220170-20

常温运输和保存，PMSF 需要-20℃保存

BINGENE

MBP 麦芽糖结合蛋白纯化试剂盒

使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址：www.bingene.com；电话：400-6005850；电邮：order@bingene.com

产品及特点

MBP（麦芽糖结合蛋白，Maltose Binding Protein）标签蛋白大小为 40 kDa，由大肠杆菌 K12 的 malE 基因编码。MBP 可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。如果蛋白在细菌中表达，MBP 可以融合在蛋白的 N 端或 C 端。MBP 融合蛋白可通过交联淀粉亲和层析一步纯化，结合的融合蛋白可用 10 mM 麦芽糖在生理缓冲液中进行洗脱。如果要去除 MBP 融合部分，可用位点特异性蛋白酶切除。可用 MBP 抗体或表达的目的蛋白特异性抗体检测 MBP 标签标记的重组蛋白。由于 MBP 融合蛋白原核表达载体具有表达效率高，易于纯化等优点。在现代分子克隆中 MBP 常作为融合蛋白被广泛应用。本产品就是专门用于分离纯化 MBP 融合蛋白的试剂盒，它具有下列特点：

1. 一站式套装，含所需的直链淀粉和琼脂糖介质、溶液和层析柱，操作非常方便。
2. 提供 2 mL 直链淀粉-琼脂糖介质，其最大载量为 10 mg MBP 蛋白/mL 介质。
3. 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。
4. 本试剂盒足够 20 次制备，但介质可以反复使用更多次（需要复活）。
5. 本产品只能用于科研。

规格及成分

成份	编号	规 格	包装材料
直链淀粉-琼脂糖介质	220170A	2 mL	5mL 本色瓶
1 M Tris-HCl（pH 7.4）	25-07640	25 mL	30mL 本色瓶
0.1 M EDTA 溶液	131181	25 mL	30mL 本色瓶
2 M NaCl 溶液	25-06280	50 mL	60mL 本色瓶
蔗糖	57-50-1	20 g	30mL 本色瓶
PMSF（10 mg/mL）(in 异丙醇)	100833	1 mL	2.0mL 白盖
0.1 mM $MgCl_2$ 溶液	220170B	50 mL	60mL 本色瓶
0.1 M 麦芽糖溶液	220170C	25 mL	30mL 本色瓶
层析柱（6 mL）	110809	1 支	1 袋
使用手册	220170sc	1 份	无

运输及保存

常温运输和保存，但介质需 4℃保存，PMSF 需要-20℃保存，有效期一年。

自备试剂

去离子水、20%乙醇、0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜

使用方法

1. 将直链淀粉-琼脂糖介质充分混匀后，取适量加入到预放了一片筛板的层析柱中（介质用量需要根据 MBP 蛋白产量决定，其最大载量为 10 mg MBP 蛋白/mL 介质，请根据实验需要取适量的介质加入层析柱中）。

2. 用 5 倍柱体积（柱体积指的是填料介质的体积，下同，本试剂盒介质的体积是 2mL）自备去离子水洗柱，共 3 次。

3. 用 5 倍柱体积（约 10mL）的新配的结合缓冲液洗柱，进行平衡，使填料介质处于与目的蛋白相同的缓冲体系下，起到保护蛋白的作用。结合缓冲液的配方如下（以 10 mL 为例）：

成分	用量	在结合缓冲液中的浓度
1 M Tris-HCl（pH 7.4）	0.2 mL	20 mM
0.1 M EDTA 溶液	0.1 mL	1 mM
2 M NaCl 溶液	1 mL	200 mM
自备去离子水	8.7 mL	-

4. 4℃ 5000 g 离心 10 分钟收集 20 mL 表达菌液，弃上清，将细胞沉淀（约 100 mg）悬于 2 mL 冰冷的现配的细胞洗涤液中，4℃ 5000 g 离心 15 分钟收集细胞沉淀后，再次悬于 2 mL 冰冷的细胞洗涤液中。（最好用不加诱导物的菌液做对照样。）细胞洗涤液的配方如下（以 10 mL 为例）：

成分	用量	在细胞洗涤液中的浓度
1 M Tris-HCl（pH 7.4）	0.1 mL	10 mM
2 M NaCl 溶液	0.15 mL	30 mM
自备去离子水	9.75 mL	-

6. 制备细胞裂解物：

1) 如果所用载体不带 MBP 信号肽序列（如 pMAL-c2）

a) 超声破碎细胞，功率 30 W，保持细胞低温（0℃），直到在显微镜下看见绝大多数细胞破裂。（超声参数需根据仪器型号自行摸索，但裂解物必须不粘稠，否则会堵塞层析柱。）

b) 为使溶液澄清，向上述细胞洗涤液中加入 35 uL PMSF（10 mg/mL）。

c) 4℃下 13000-15000 g 离心 30 分钟，以去除残留细胞和细胞碎片以防堵柱，收集上清样品，留样做 SDS-PAGE 电泳对照，其余样品用于纯化 MBP 融合蛋白，直接进入第 6 步。

2) 如果所用载体带 MBP 信号肽序列（如 pMAL-p2）

a) 4℃ 5000 g 离心 15 分钟收集细胞，沉淀悬于 1 mL 冰冷的现配的细胞裂解液中。细胞裂解液的配方如下（以 10 mL 为例）：

成分	用量	在细胞裂解液中的浓度

1 M Tris-HCl（pH 7.4）	0.3 mL	30 mM
0.1 M EDTA 溶液	0.01 mL	0.1 mM
蔗糖	2 g	20%（*m*/V）
自备去离子水	加水到 10 mL	-

b) 加入 25 uL PMSF（10 mg/mL），室温搅动 15 分钟，于 4℃ 13000-15000 g 离心 10 分钟收集细胞。

c) 旋动细胞沉淀，加入 2 mL 冰冷的 0.1 mM $MgCl_2$ 溶液，4℃搅动 10 分钟。

d) 休克细胞 4℃ 13000-15000 g 离心 10 分钟，在上清中加入 10 mM Tris-HCl（pH 7.4）（可将 1 M Tris-HCl，pH 7.4 稀释 100 倍配制而成）至 pH 为 7.4。

e) 上清用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤，滤液用 100 倍体积的 10 mM Tris-HCl（pH 7.4）（配方如上）4℃透析。

f) 收集透析后样品，留样做 SDS-PAGE 电泳对照，其余样品用于纯化 MBP 融合蛋白，直接进入第 6 步。

7. 将样品加到平衡好的直链淀粉-琼脂糖介质中（保证目的蛋白与介质充分接触，以提高目的蛋白的回收率），收集流出液。

8. 用 10-15 倍柱体积的结合缓冲液（配方见上表）进行清洗，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液。

9. 使用 5-10 倍柱体积的现配的麦芽糖洗脱液洗脱结合的融合蛋白，收集洗脱液（即目的蛋白组分）。麦芽糖洗脱液的配方如下（以 10 mL 为例）：

成分	用量	在麦芽糖洗脱液中的浓度
1 M Tris-HCl（pH 7.4）	0.2 mL	20 mM
0.1 M EDTA 溶液	0.1 mL	1 mM
0.1 M 麦芽糖溶液	1 mL	10 mM
自备去离子水	8.7 mL	-

10. 将纯化得到的样品（包括流出液、洗杂液和洗脱液）以及原始样品使用 SDS-PAGE 检测纯化效果。

11. 填料介质清洗：依次使用 3 倍柱体积的结合缓冲液和 5 倍柱体积的去离子水平衡介质，最后再用 5 倍柱体积的 20%的乙醇平衡，然后保存在等体积的 20%的乙醇中，置于 4℃保存，防止填料被细菌污染。本介质可重复使用。

蛋白酶切割释放靶蛋白（可选步骤，所用试剂需自备）

12. 用适当的蛋白酶切割融合蛋白释放靶蛋白。

1) 加入自备的凝血酶、肠激酶或 Xa 因子（根据融合蛋白中的位点选择）。每毫升介质中加入 50 单位的溶于 1 mL PBS 溶液的蛋白酶。颠倒离心管数次混匀，室温下振荡 2-16 小时。
2) 4℃以 500 g 离心 5 分钟，上清小心转移到新离心管中。
3) 用传统的层析方法或 SDS-PAGE 电泳分离靶蛋白和蛋白酶。

问题解答

问题	原因分析	推荐解决方案
柱子反压过高	填料被堵塞	按照第 10 步进行介质清洗。
		裂解液中含有微小的固体颗粒，建议上柱前使用滤膜（0.22 or 0.45 μm）过滤，或者离心去除。
目的蛋白没有吸附	目的蛋白未表达	确保目的蛋白表达
	样品或缓冲液中存在一些干扰因素如非离子去污剂	样品透析或用结合缓冲液稀释
	细胞产生大量的淀粉酶影响结合力	培养基中添加葡萄糖，抑制淀粉酶的表达
	融合蛋白使麦芽糖结合位点阻塞或扭曲，影响了目的蛋白的结合力	更换载体
	柱子结合时间太短	将样品与介质振荡孵育 4 度 2 小时或更长时间
洗脱样品较杂	目的蛋白降解	加一些蛋白酶抑制剂，如 PMSF、EDTA 等
	平衡/洗杂不充分	增加平衡液体积，确保介质充分平衡/洗杂，如介质太脏按照第 10 步进行树脂清洗

关联产品

His-标签蛋白纯化试剂盒