

MBP标签纯化试剂盒

产品货号: BA3232

产品规格: 5ml

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10mM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。

产品内容:

产品组成	规格	保存条件
Dextrin Beads 6FF	5ml	2-8°C
裂解缓冲液	100ml	2-8°C
漂洗缓冲液	100ml	2-8°C
洗脱缓冲液	50ml	2-8°C
3ml AC层析空柱	10套	2-8°C

注: 洗脱液不含麦芽糖, 需额外添加0.18g麦芽糖至洗脱缓冲液中, 以配置10mM的洗脱液, 配置完后可用0.22um或者0.45um滤器过滤, 并将溶液保存在4°C。

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。

- 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。
- 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。
- 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。
- 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。

- 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。

- 按步骤1(e), 离心收集1ml菌液的细菌沉淀并弃上清, 加入100μl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)。



扫一扫 加微信

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. 按步骤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：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。

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0.45μm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. 洗脱缓冲液需额外添加0.18g麦芽糖配置后使用。
6. 菌