



版本号：DE250930

MBP-Tag Protein purification Kit I

MBP 标签蛋白纯化试剂盒 I 型（超声裂解）

产品编号：PTE012

产品内容：

产品编号	产品组分	规格 (10 T)	储存温度
CS20163	Dextrin Beads (50%) (切勿冷冻!)	5 mL	2-8°C
PTE012-1	超声裂解缓冲液 (仅 I 型提供)	30 mL	2-8°C
PTE012-2	洗涤液	125 mL	2-8°C
PTE012-3	洗脱液	70 mL	2-8°C
CXZ-6	层析柱 (6 mL)	10 个	RT
PTE012-4	PMSF 溶剂	1 mL	2-8°C
PTE012-5	PMSF 干粉	10 mg	2-8°C

运输及储存条件： 蓝冰运输；各组分按照表中所示温度进行储存，保质期 18 个月；PMSF 溶解后需-20°C储存，保质期 12 个月。

产品介绍：

MBP (麦芽糖结合蛋白, Maltose Binding Protein) 由大肠杆菌 K12 的 *malE* 基因编码，蛋白大小约 42kDa，可增加在细菌中过量表达的融合蛋白的溶解性，促进融合蛋白的正确折叠，尤其适用于真核蛋白。

本试剂盒可满足 10 次 MBP 标签蛋白的纯化 (50 mL 体积的细菌)，提供 5 mL 浓度为 50% 的 Dextrin Beads 介质，每 mL 介质可吸附~20 mg (80 kDa) MBP 标记的蛋白质。实际使用情况与分子量大小和蛋白特性相关，纯化量有所差别。本试剂盒只能在非变性条件下使用，只可用于纯化没有形成包涵体的可溶性 MBP 标签蛋白。



操作步骤：

一、重组蛋白的表达和细菌收集

1. 将目的质粒转化大肠杆菌表达感受态 (Rosetta-DE3(CC555)/BL21-DE3(CC553))，菌 P 鉴定后挑单克隆，接种到 3-5 mL 含适当抗生素的 LB 液体培养基中，37°C 培养过夜。
2. 按照 1:100 的比例取培养过夜的菌液，接种到含抗生素的 LB 液体培养基中。

注：具体的培养体积根据需要纯化的蛋白量而定。

3. 37°C 振荡培养直到 OD 600 达到 0.6-0.8。
4. 加入 IPTG 至终浓度为 1 mM，16°C 振荡培养 18-20 h 或 37°C 振荡培养 3-4 h。

注：首次尝试建议用不加诱导物的菌液做对照。对于特定蛋白的诱导表达，最佳的 IPTG 浓度、诱导温度和时间需要通过实验确定。

5. 取 50 mL 表达菌液，5000×g，4°C 离心 10 min，弃上清，收集沉淀。沉淀可直接用于裂解或置于 -80°C 冻存备用（如选配冻融法裂解，可将沉淀与裂解液充分混匀后再冻存）。

二、裂解（超声破碎/冻融法，二选一）

1. **超声破碎细菌：**在 50 mL 细菌沉淀中加入 2.5 mL 冰浴的超声裂解缓冲液，再加入 60 μL PMSF (10 mg/mL) 溶液，冰上超声裂解菌体直到在显微镜下看见 90% 以上细胞破裂。超声参考条件：功率 200-300 W，每次超声处理 10 s，间隔 10 s，共超声处理 15 min。

注：根据 MBP 标签蛋白表达丰度，菌液和超声裂解缓冲液的体积比可以在 25:1-5:1 范围内适当调整。超声参数需根据仪器型号自行摸索和优化。

2. **冻融法裂解细菌：**在 50 mL 细菌沉淀中加入 5 mL 冰浴的冻融裂解液，再加入 60 μL PMSF (20 mg/mL) 溶液，将裂解液和菌体沉底打散混匀，置于 -20°C 及以下冰箱冷冻结实，取出后 **室温自然化冻**，轻轻涡旋数下，以充分裂解细菌，尽量避免产生气泡。

注：根据 MBP 标签蛋白表达丰度，菌液和冻融裂解缓冲液的体积比可以在 30:1-10:1 范围内适当调整。裂解物必须不粘稠，否则会堵塞层析柱。

3. 将超声裂解法或冻融解法得到的细胞裂解物在 13,000×g，4°C 离心 10 min。吸取上清即为 MBP 标签融合蛋白溶液。
4. **(选做)** 如果裂解后上清非常粘稠，可加入全能核酸酶 (SL2181) 降解核酸，降低上清粘稠度，或者使用注射器反复抽吸，以剪切粘稠的基因组 DNA 等。然后再次离心。

注：预留少量（如 100 μL）作为 **裂解液** 留样进行 SDS-PAGE 电泳检测，其余用于纯化。



三、MBP 标签蛋白纯化

1. 将 Dextrin Beads 充分混匀，用剪过的枪头吸取 0.5 mL 介质于 15 mL 离心管中（自备）， $1000\times g$ 、 4°C 离心 30 s，去上清。
2. 加入 0.25 mL 洗涤液重悬平衡介质，离心去上清，重复平衡 2-3 次。
注：介质用量需要根据 MBP 标签蛋白产量决定，请根据实验需要取适量的 Dextrin Beads 进行实验，洗涤液平衡介质体积按照比例进行增减。
3. 加入蛋白裂解液上清，将介质重悬均匀后在 4°C 侧摆摇床或水平摇床上结合 1-12 h（初次操作结合时间可设置在 2-4 h 检测结合效果后进行调整）。
4. 放一片筛板至层析柱并盖上底部盖子，用剪去尖端的吸头吸取上清与介质混合液至层析柱，去掉盖子，在自然重力下让裂解液自然流出，收集**流穿液**留作后续 SDS-PAGE 电泳。
5. 用 1 mL 洗涤液洗柱 3-5 次，收集并保存每次的**洗涤液**，进行 SDS-PAGE 电泳，并根据电泳结果中蛋白残留情况增减洗涤次数。
6. 用 2 mL 洗脱液洗脱 1-3 次，收集并保存每次**洗脱液**，进行 SDS-PAGE 电泳，根据电泳结果中蛋白洗脱情况增减洗脱次数。
注：若使用的洗脱液体积较少，添加后未能将介质完全覆盖，可能存在洗脱不充分的情况，此时可将洗脱液重新加入层析柱或多次洗脱以提高蛋白回收率。也可根据所需蛋白浓度适当调整洗脱体积。
7. 洗脱后，依次使用 3 倍柱体积（指 Dextrin Beads 体积，下同）的洗涤液和 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°C 保存，防止填料被细菌污染。本介质可重复使用。

五、在位清洗

Dextrin Beads 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，需要进行在位清洗操作（Cleaning-in-Place, CIP），具体操作如下：

1. 5 倍柱体积的去离子水清洗。
2. 3 倍柱体积的 0.1% SDS 或 0.5 M NaOH 溶液洗杂。
3. 5 倍柱体积去离子水清洗。可以立即使用，如不立即使用，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°C 保存。



常见问题与解决建议

1. 裂解液中目的蛋白含量低

- (1) 感受态活力不足，重新转化大肠杆菌表达感受态。
- (2) 调整蛋白表达条件：如 IPTG 浓度、诱导温度和时间等。

2. 蛋白无法与介质结合，或结合效率较低

- (3) 尽量使用新鲜诱导表达的菌液。
- (4) 收集流穿反复上样或增加蛋白与介质结合时间（如 4°C 过夜）。
- (5) 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，更换载体或在融合蛋白与标签间添加 linker 以增加二者间距离。
- (6) MBP 标签丢失或未表达，WB 检查 MBP 标签并测序检查基因序列的读码框是否正确。
- (7) 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。
- (8) 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。

3. 纯化目的蛋白纯度较低

- (1) 上样量太大，洗涤液洗涤不彻底。
- (2) 平衡/洗涤不充分，增加结合缓冲液液体积，确保介质充分平衡/洗涤，如介质太脏在位清洗（CIP）步骤进行介质清洗。
- (3) 杂蛋白为目的蛋白降解片段，蛋白样品收集后宜尽快完成纯化工作，并应始终放置在 4°C 或冰浴，减缓蛋白降解。为有效抑制蛋白降解，可以在裂解液中添加适量的蛋白酶抑制剂混合物，例如 SL1086 蛋白酶抑制剂混合物（细菌，100×）或 SL1088 蛋白酶-磷酸酶复合抑制剂（100×）。

4. 蛋白在纯化过程中形成沉淀或聚集

- (1) 控制纯化过程中的温度，避免温度过高或过低，一般在 4°C 左右进行纯化可减少蛋白沉淀或聚集。

5. 层析柱堵塞或流速较低

- (1) 上样样品含杂质颗粒，将样品过滤通过 0.22 μm 或 0.45 μm 的滤膜过滤，或在 13,000 × g，4°C 离心离心 15 min 或更长时间。
- (2) 非特异性结合的蛋白的增多和蛋白的聚集，按照在位清洗（CIP）步骤进行介质清洗。

注意事项：

1. 请勿在 -20°C 或更低温度冷冻保存 Dextrin Beads。
2. 保存和纯化过程中应始终保持纯化凝胶介质湿润。
3. 纯化过程中的各步骤留样体积根据具体纯化体积确定，仅供参考。
4. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得存放于普通住宅内。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。