

M5 HiPer MBP 蛋白纯化层析介质 (6FF)

使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPer MBP 蛋白纯化层析介质 (6FF)	5ml	MF210-01
M5 HiPer MBP 蛋白纯化层析介质 (6FF)	25ml	MF210-05

【STORAGE】

2-8°C, 避免冷冻

【产品简介】

Dextrin MBP 蛋白纯化层析介质 (6FF) 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。本层析介质可以一步纯化 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。

表 1. Dextrin MBP 蛋白纯化层析介质 (6FF) 产品性能

性能	指标
基质	高度交联的 6%琼脂糖微球
配体	糊精
载量 (/ml 介质)	>10 mg MBP 蛋白 (80 kDa)
粒径 (μm)	45-165
最大流速	0.3 MPa, 3 bar
pH 稳定范围	3-12
储存缓冲液	20% 乙醇
储存温度	4-8°C

【操作步骤】

2.1 Buffer 的准备

所用水和 Buffer 在使用之前建议用 0.22μm 或 0.45μm 滤膜过滤。

结合/洗杂 Buffer: 20mMTris-HCl, 200mMNaCl, 1mMEDTA,pH7.4

洗脱 Buffer: 20mMTris-HCl,1mM EDTA,10mM 麦芽糖,pH7.4

注意: 结合液和洗脱液中可加入 1mM DTT 或 10mMβ-巯基乙醇

2.2 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。

2.3 层析介质装填

本层析介质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填装。

层析柱的装填（使用储液器装填）

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，并在柱底部留出 1-2cm 的去离子水。
2. 将层析介质悬浮起来，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，开起泵，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，可以用你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，将分配器至于层析柱中。
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。

2.4 样品纯化

将层析介质装入合适的层析柱，层析用 5 倍柱体积的结合 Buffer 进行平衡，使层析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。

将样品加到平衡好的层析介质中（保证目的蛋白与层析介质充分接触，提高目的蛋白的回收率），收集流出液。

用 10-15 倍柱体积的洗杂 Buffer 进行清洗，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液。

使用 5-10 倍柱体积的洗脱 Buffer，收集洗脱液，即目的蛋白组分。

依次使用 3 倍柱体积的结合 Buffer 和 5 倍柱体积的去离子水平衡层析介质，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，防止层析介质被细菌污染。

2.5 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。

3. 层析介质清洗

本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层析介质进行清洗。

1. 3 倍柱体积的去离子水；
2. 3 倍柱体积的 0.1%SDS 或 0.5MNaOH 溶液；
3. 3 倍柱体积去离子水，20%乙醇 2-8℃保存。

4. 问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
柱子反压过高	层析介质被堵塞	按照第3部分进行层析介质清洗。
		裂解液中含有微小的固体颗粒，建议上柱前使用滤膜 (0.2 or 0.45 μ m) 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buffer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	将样品与本层析介质4 $^{\circ}$ C振荡孵育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，确保层析介质充分平衡/洗杂，如层析介质太脏按照第3部分进行层析介质清洗

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。