

蛋
白
质
系
列

CAT#: 90510-2

常温运输及保存（溶菌酶需要-20℃保
存）

TIANDZ

包涵体大量纯化试剂盒

Inclusion Body Maxi Isolation Kit

使用手册 V1.0

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

<p>产品及特点</p>	<p>本产品是天泽基因包涵体微量纯化试剂盒 (CAT#: 90508) 的大提升级产品, 用于大量, 快速的提取高质量的包涵体。它具有下列特点:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 大量提取, 1 次可处理多达 5 升的菌液, 相当于 50 次中量提取。 2. 适合制备级别的包涵体纯化, 需在 50 mL 以上的离心管或离心瓶中完成。 3. 能有效去除包涵体中的细胞壁和细胞膜等非重组蛋白成份, 使重组蛋白在包涵体中所占比重达到 60% 以上。 4. 即可以选择高压裂解法, 也可以采用酶学裂解法裂解细菌。 5. 得到的包涵体可以用于重折叠, 也可以用于凝胶层析和动物免疫。 																					
<p>规格及成分</p>		<table border="1"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>编号</th> <th>2 次包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>溶液 A</td> <td>90510A</td> <td>100 mL</td> </tr> <tr> <td>溶液 B</td> <td>90510B</td> <td>250 mL×2</td> </tr> <tr> <td>包涵体溶解液</td> <td></td> <td>100 mL</td> </tr> <tr> <td>溶菌酶</td> <td>100406</td> <td>100 mg</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>90510sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>	成份	编号	2 次包装	溶液 A	90510A	100 mL	溶液 B	90510B	250 mL×2	包涵体溶解液		100 mL	溶菌酶	100406	100 mg	使用手册	90510sc	1 份		
成份	编号	2 次包装																				
溶液 A	90510A	100 mL																				
溶液 B	90510B	250 mL×2																				
包涵体溶解液		100 mL																				
溶菌酶	100406	100 mg																				
使用手册	90510sc	1 份																				
<p>运输及保存</p>	<p>常温运输, 4℃ 保存 (溶菌酶需要 -20℃ 保存, 包涵体溶解液可以室温保存), 有效期一年。</p>																					
<p>自备试剂</p>	<p>如果得到的重组蛋白确有降解则需要自备蛋白酶抑制剂混合物 (CAT#: 80808)</p>																					
<p>使用方法</p>	<p>一. 细胞沉淀:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 转移 1-5 升菌液到干净的、预称重量的塑料离心瓶中。如果离心瓶体积不够大, 可以分多次反复离心收集。 2. 5,000 g (相当于 Sorvall GSA 转头 5500 rpm) 4℃ 离心 15-30 分钟, 小心弃上清。 3. 复称重量, 差值就是细菌的湿重。1 升的过夜培养的大肠杆菌湿重一般为 3 克, 所以 1-5 升菌液一般能得到 3-15 克细菌。注意: 后续操作的很多溶液都是按此步得到得细胞湿重添加。 4. 细胞沉淀可以立即使用或存放在 -80℃ 待用。 <p>二. 细胞裂解(下面两法中选其一):</p> <p>高压破碎法 (French Press) + 超声法 (推荐方法)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 按每克细菌湿重加入 3 mL 溶液 A 重悬细胞, 可以用玻璃棒搅拌或用 Waring 捣碎机匀浆 (如果细菌湿重超过 10 克) 使细菌悬浮, 直到检测不到成块的细 																					

- 胞为止。如有必要，可以加入溶菌酶干粉，使其终浓度为 0.2mg/mL。
2. 让细胞通过压力为 16000-18000 lb/in² 的高压细胞破碎仪，收集的细胞裂解液需放冰上。
 3. 重复上步操作一次或多次，直到绝大部分细菌都被裂解。注意：每次处理后最好在显微镜下检查细菌裂解的比例。
 4. 将细胞裂解液置于冰浴中，用超声破碎仪满功率下超声处理 5 分钟，工作状态为 50% (开 0.5 秒，关 0.5 秒)。此过程中最好将细胞裂解液放冰上并用磁力搅拌器搅拌，否则产生的热量会使包涵体蛋白变性，在纯化中丢失。

酶法+超声法（在没有高压破碎仪器时首选方法）

1. 按每克细菌湿重加入 3 mL 的含溶菌酶的溶液 A 重悬细胞，可以用玻璃棒搅拌细菌沉淀使之悬浮。
2. 在细菌悬浮液中加入溶菌酶干粉，使其终浓度为 0.2mg/mL，搅拌混匀后 37℃ 放置 30 分钟裂解细菌，其间不时需要用玻璃棒混匀。细菌释放出的 DNA 将使裂解物变得十分粘稠。如果不粘稠，说明裂解不充分，需要继续裂解，否则完整细菌将和包涵体一起沉淀，影响包涵体的纯度。由于处理量大，最好在显微镜下检查细菌是否充分裂解。
3. 将细胞裂解液置于冰浴中，用超声破碎仪满功率下超声处理 5 分钟，工作状态为 50% (开 0.5 秒，关 0.5 秒)。此过程中最好将细胞裂解液放冰上并用磁力搅拌器搅拌，否则产生的热量会使包涵体蛋白变性，在纯化中丢失。

三. 包涵体纯化：

1. 将超声处理的细胞裂解液转移到离心瓶中，22,000g 4℃ 下高速离心 60 分钟（注意：转子不同其对应的离心速度不同），小心收集上清。上清含有以可溶形式存在的重组蛋白，可以保留作为 SDS-PAGE 对照样品。
2. 将沉淀（主要由包涵体构成）悬浮在预冷的溶液 B 中。每克细菌需要 5 mL 溶液 B，1 升细菌的湿重约 3 克，大约需要 15 mL 溶液 B，用玻璃棒或匀浆器搅拌混匀后室温放置 5 分钟。
3. 22,000g 4℃ 下高速离心 30 分钟，沉淀将出现三层，最下面的是未彻底破裂的细胞碎片，其上为包涵体，最上层的松软沉淀是细胞壁和细胞外膜。如果处理过程中使用过溶菌酶，则此层较薄。小心收集上清，可以作为包涵体第一次洗涤的对照样品。

4. 重复第 8-第 9 步直到上清变清和最上层细胞壁和细胞外膜松软沉淀消失，此过程一般需要重复洗涤 2 次（共 3 次洗涤），小心收集上清作为包涵体第二次洗涤和第三次洗涤的对照样品。本试剂盒提供的溶液 B 足够一次 5 升规模的提取洗 3 次，如需更多溶液 B 请单独购买。
5. 上步得到的沉淀即为包涵体，其中重组蛋白一般占 60%重量，其余 40%为其他蛋白质。此沉淀可以长期放置在-80℃冰箱待用，也可以直接用于免疫动物制备抗体，还可以直接进入下面得包涵体的溶解步骤。
6. 估计重组蛋白的产率：首先需要通过预实验知道重组蛋白的表达水平，如果表达水平为 1%，则 1 克湿重的细菌中将含有 1 mg 重组蛋白质。此法得到的重组蛋白质的回收率一般在 75%，即 1mg 重组蛋白质能得到 0.75 mg，丢失 0.25mg。

四. 包涵体的溶解：

1. 在室温下，将包涵体溶解液加入到包涵体沉淀中，用枪头充分吹打后漩涡震荡。如果需要将溶解的包涵体直接用于凝胶过滤层析进一步纯化，则按每克原始细胞湿重加入 1 mL 包涵体溶解液，重组蛋白的浓度约为 4-5 mg/mL；如果需要将溶解的包涵体直接用于蛋白质折叠，则按每克原始细胞湿重加入 3 mL 包涵体溶解液，重组蛋白的浓度约为 1-2 mg/mL；注意：包涵体溶解液低温放置会产生沉淀，必须 45-65℃溶化并混匀后才能使用。
2. 室温放置 1 小时使蛋白质充分溶解。
3. 100,000g 4℃离心 60 分钟(转速需要根据离心机转子的大小换算)，小心收集上清，保留不溶性沉淀。注意：检查离心管能否承受此离心力。SDS-PAGE 检查是否大部分重组蛋白都在上清中。如果没有，说明包涵体没有完全溶解，需要用适当增加包涵体溶解液的用量。
4. 将上清（溶解的包涵体）分成 10-20mL 一份，放于塑料离心管中（不要超过离心管容量的 70%）置-80℃长期保存或直接用于复性等试验。由于不同的蛋白质有不同的最佳复性条件，需要用户自己摸索。包涵体纯化过程中引入了溶菌酶，在 SDS-PAGE 分析时可能有额外条带出现。

关联产品

包涵体微量提取试剂盒（CAT#: 90508-50），包涵体中量提取试剂盒（CAT#: 90509-5)