

CAT#: 90509-5

常温运输及保存，但溶菌酶和
Benzonase 需要低温运输，-20℃保
存

TIANDZ

包涵体中量纯化试剂盒

Inclusion Body Midi Isolation Kit

使用手册 V1.1

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

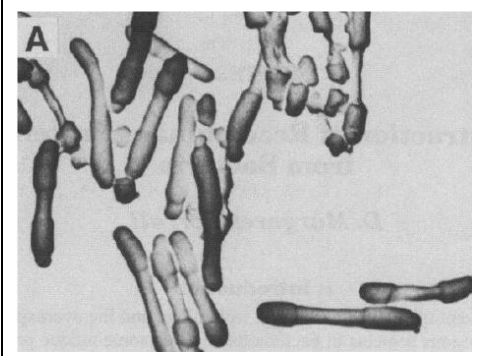
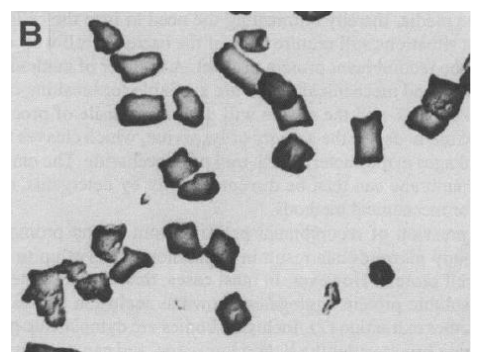
网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

产品及特点	本产品是天泽基因包涵体微量纯化试剂盒（CAT#：90508）的中量提取升级产品，用于中量，快速的提取高质量的包涵体。它具有下列特点： 1. 中量提取，一次可以处理 30-50 mL 的菌液，一次中量提取相当于 10-20 次微量提取。 2. 操作简单快速，整个过程只要四十分钟左右。 3. 大规模提取，可以在 15-50 mL 离心管中完成。 4. 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，使重组蛋白所占比重达到 60%以上。 5. 细胞裂解通过非离子洗涤剂的化学裂解法，裂解更加温和。 6. 得到的包涵体可以用于重折叠。																							
规格及成分	<table><tr><th>成 份</th><th>编 号</th><th>5 次大纸盒包装</th></tr><tr><td>溶液 A</td><td>90509A</td><td>25 mL</td></tr><tr><td>溶液 B</td><td>90509B</td><td>250 mL</td></tr><tr><td>包涵体溶解液</td><td>90509C</td><td>25 mL</td></tr><tr><td>溶菌酶（CAT#:100406-3）</td><td>100406-3</td><td>3 g</td></tr><tr><td>Benzonase(1U/uL) (Cat#:101001)</td><td>101001</td><td>125 uL</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>90509sc</td><td>1 份</td></tr></table>	成 份	编 号	5 次大纸盒包装	溶液 A	90509A	25 mL	溶液 B	90509B	250 mL	包涵体溶解液	90509C	25 mL	溶菌酶（CAT#:100406-3）	100406-3	3 g	Benzonase(1U/uL) (Cat#:101001)	101001	125 uL	使用手册	90509sc	1 份		
成 份	编 号	5 次大纸盒包装																						
溶液 A	90509A	25 mL																						
溶液 B	90509B	250 mL																						
包涵体溶解液	90509C	25 mL																						
溶菌酶（CAT#:100406-3）	100406-3	3 g																						
Benzonase(1U/uL) (Cat#:101001)	101001	125 uL																						
使用手册	90509sc	1 份																						
运输及保存	常温运输及保存，但溶菌酶和 Benzonase 需要低温运输，-20℃保存，有效期一年。																							
自备试剂	无																							
使用方法	准备工作： 将 3 g 溶菌酶全部加入到 25 mL 溶液 A 中溶解，然后根据每次的需要量（一次大量提取需要 5 mL)分成 1mL/ 只放-20℃待用。每次只取用一管含溶菌酶的溶液 A。包涵体中的重组蛋白一般比溶解状态中的蛋白质更能够抵抗微量内源性蛋白水解酶的降解，如果实验发现得到的重组蛋白确有降解，则需要在溶液 A 中新鲜加入自备的蛋白酶抑制剂混合物（CAT#：80808）。 一．细胞裂解和包涵体的纯化： 1. 在蛋白诱导期结束时，转移 30 mL 菌液到一个干净的塑料离心管中。 2. 5,000-7,000 rpm 室温离心 3 分钟，小心弃上清。 3. 加入 5 mL 含溶菌酶的溶液 A 重悬细胞。																							

4. 室温放置 10-20 分钟裂解细菌，其间可以用手轻弹离心管混匀。
5. -20℃冷冻至凝固。凝固有利于裂解细菌，所以一定要凝固到细菌溶液变成固体。
6. 室温水浴解冻。如果裂解充分，细菌释放出的 DNA 将使裂解物十分粘稠。如果不粘稠，说明裂解不充分，需要重复 3-6 步，否则完整细菌将和包涵体一起沉淀，影响包涵体的纯度。如有条件最好在显微镜下检查细菌是否充分裂解。
7. 加入 25 uL 的 Benzonase (1U/uL)，脱色摇床上摇晃直到裂解液不再粘稠，一般需要 30 分钟左右（检查方式是将裂解物倾倒转移到另一离心管中，在转移过程中看其是否粘稠）。
8. 5,000-7,000 rpm 4℃离心 5 分钟，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。
9. 将沉淀（主要由包涵体构成）悬浮在 25 mL 的溶液 B 中，轻柔混匀后室温放置 5 分钟。
10. 5,000-7,000 rpm 4℃离心 10 分钟，小心收集上清，可以作为包涵体第一次洗涤的对照样品。
11. 将沉淀（主要由包涵体构成）悬浮在 25mL 的溶液 B 中，轻柔混匀后室温放置 5 分钟。
12. 5,000-7,000 rpm 4℃离心 10 分钟，小心收集上清作为包涵体第二次洗涤的对照样品。一般洗涤两次就能够得到足够纯净的包涵体，如果需要更多洗涤，需要用户单独购买包涵体洗涤液（溶液 B）。
13. 得到的沉淀即为包涵体，可以长期放置在冰箱待用或直接进入包涵体的溶解步骤。

二. 包涵体的溶解：

1. 在包涵体沉淀中加入 5 mL 包涵体溶解液，用枪头充分吹打后漩涡震荡。如果低温放置，包涵体溶解液会产生沉淀，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. 20000g 4℃离心 20 分钟，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. 得到的蛋白质溶液可以用于复性等试验。由于不同的蛋白质有不同的最佳复性条件，所以本公司不能提供统一的复性溶液，需要用户自己摸索。

	注意：包涵体纯化过程中引入了溶菌酶、DNase 和 RNase 等外源蛋白质，在 SDS-PAGE 分析时可能有额外条带出现。	
技术资料	包涵体	
	含有包涵体大肠杆菌扫描电镜照片	纯化后包涵体扫描电镜照片
		
	包涵体是指细菌表达的蛋白在细胞内凝集，形成无活性的固体颗粒。一般含有 50% 以上的重组蛋白，其余为核糖体成份、RNA 聚合酶、外膜蛋白 ompC、ompF 和 ompA 等，环状或缺口的质粒 DNA，以及脂体、脂多糖等，大小为 0.5-1um，难溶于水，只溶于变性剂如尿素、盐酸胍等。 包涵体的形成原因之一是重组蛋白表达量过高，表达量越高越容易形成包涵体。原因可能是合成速度太快，以至于没有足够的时间进行折叠，二硫键不能正确的配对，过多的蛋白间的非特异性结合，蛋白质无法达到足够的溶解度等。原因之二是重组蛋白含硫氨基酸较多，而脯氨酸的含量也与包涵体的形成呈正相关。此外，发酵温度高或胞内 pH 接近蛋白的等电点也容易诱发包涵体的形成。异源重组蛋白缺乏翻译后修饰所需酶类，致使中间体大量积累，也容易形成包涵体沉淀。共表达分子伴侣的方法可以降低包涵体的形成。 包涵体的好处是它可以避免蛋白酶对外源蛋白的降解。包涵体的形成降低了胞内外源蛋白的浓度，有利于表达量的提高。此外，包涵体中杂蛋白含量较低，且只需要简单的低速离心就可以与可溶性蛋白分离，有利于分离纯化。最后，对机械搅拌和超声破碎不敏感，易于破壁，并与细胞膜碎片分离。	
关联产品	包涵体微量提取试剂盒（CAT#：90508-50），包涵体大量提取试剂盒（CAT#：90510-2）	