

蛋
白
质
系
列

CAT#: 100302-100
常温运输和保存

TIANDZ

包涵体蛋白溶解及复性试剂盒

Inclusion Body Solubilization and Refolding 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>本产品用 E.coli 作为宿主表达得到的重组蛋白往往会形成包涵体，其中的重组蛋白质只完成部分折叠，还没形成最后的正确空间结构，所以没有生物活性，要得到有活性的重组蛋白，还需要后续的溶解和复性（重折叠）处理。目前最常用的溶解包涵体的方法是用尿素，Sarkosyl，盐酸胍等强变性剂，其缺点是包涵体中的重组蛋白质被彻底变性，使后续的蛋白质复性处理效率降低。本产品根据包涵体中的重组蛋白质已经完成了部分折叠这一事实设计，具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 一站式，提供包涵体洗涤、溶解和蛋白质复性的所有试剂。 2. 采用温和法溶解包涵体，释放的包涵体蛋白质不彻底变性，还能保持其部分折叠的结构，使后续的复性处理效率提高。 3. 所用复性液基于稀释复性，经过精心优化，有利于大部分蛋白的复性。 4. 还提供五种不同的添加剂，它们可以单独加入复性液，也可以按一定比例进行自由组合，以适应不同的蛋白质折叠需求。 5. 本试剂盒提供实惠的小规格，用于做预实验用，用户如果选择到合适的溶液组合后，可以单独购买其中的溶液以用于大量制备。 6. 本试剂盒足够 100 次小规模（1mL 规模）的蛋白质复性实验。 																	
<p>规格及成分</p>	<table border="1" data-bbox="512 1128 1390 1447"> <thead> <tr> <th>成 份</th> <th>编 号</th> <th>100 次包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>包涵体洗涤液</td> <td>100302A</td> <td>250 mL</td> </tr> <tr> <td>包涵体温和溶解液（10 种各一套）</td> <td>100302B</td> <td>10×10 mL</td> </tr> <tr> <td>包涵体蛋白质复性液</td> <td>100302C</td> <td>250 mL</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>100302sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成 份	编 号	100 次包装	包涵体洗涤液	100302A	250 mL	包涵体温和溶解液（10 种各一套）	100302B	10×10 mL	包涵体蛋白质复性液	100302C	250 mL	使用手册	100302sc	1 份
成 份	编 号	100 次包装																
包涵体洗涤液	100302A	250 mL																
包涵体温和溶解液（10 种各一套）	100302B	10×10 mL																
包涵体蛋白质复性液	100302C	250 mL																
使用手册	100302sc	1 份																
<p>运输及保存</p>	<p>常温运输和保存，有效期一年。</p>																	
<p>自备试剂</p>	<p>去离子水、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、0.22 um 注射器式滤膜</p>																	
<p>使用方法</p>	<p>一、洗涤包涵体</p> <p>说明：用常规方法得到的包涵体常常含有去污剂和细胞碎片，因此需要经过充分的洗涤才能用于本实验。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 将 10mg 包涵体沉淀溶解在 5mL 包涵体洗涤液中，超声波处理 8 次或充分吹打混匀。可以适当留取 10-30uL 作为 SDS-PAGE 电泳样品待用。 2. 4℃ 12000 rpm 离心 20 分钟后弃上清。 3. 重复上面的洗涤步骤 3 次，每次留取 10-30uL 作为 SDS-PAGE 电泳样品待 																	

用。

4. 将包涵体沉淀溶解在 1 mL 包涵体洗涤液中,超声波处理 8 次或充分吹打混匀。
5. 检查包涵体的纯度:将上步得到的包涵体溶液和前几步得到的预留样品一起用于 SDS-PAGE 电泳,检查每次洗涤去除杂带的情况。
6. 检查包涵体的浓度:用自备的 BCA 蛋白检测试剂盒测试第 4 步得到的包涵体溶液的蛋白质浓度。
7. 将第 4 步得到的包涵体溶液的蛋白质浓度调到 5-10 mg/mL(如果低于此范围,则离心后用适量的洗涤液再溶解;如果高于此范围,则用洗涤液稀释),然后均分到 10 个 1.5 mL 塑料离心管中,每管 100 μ L。
8. 4 $^{\circ}$ C 12000 rpm 离心 20 分钟后弃上清。
9. 所得沉淀即纯化的待用的包涵体。

二、确定溶解包涵体的最佳条件:

1. 标记上步得到的 10 个离心管,并分别加入 10 种包涵体温和溶解液,每种 1 mL。注意:准确记录它们的对应关系。
2. 充分振荡后,室温放置 30 分钟。
3. 450 nm 检测浑浊度并记录下数据。
4. 4 $^{\circ}$ C 12000 rpm 离心 10 分钟后收集上清,此即包涵体溶解液。
5. 用 0.22 μ m 注射器式滤膜过滤包涵体溶解液。
6. 280 nm 检测包涵体溶解液的光吸收。
7. 溶解液溶解包涵体能力跟包涵体溶液浊度跟成反比,跟包涵体溶解液中 OD280 数值成正比。根据上面的数据即可确定哪种溶解液对实验中所用包涵体具有最佳溶解能力,并将在此溶解液中溶解的包涵体溶解液用于下面的复性实验。大量处理需要从本公司单独大量订购包涵体温和型溶解液 10 种中的 1 种。

三、包涵体蛋白的复性:

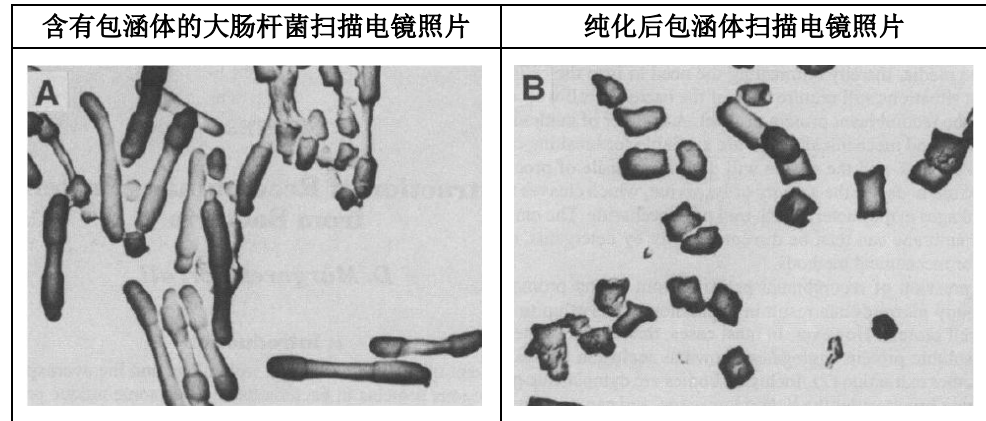
1. 在 2.5 mL 4 $^{\circ}$ C 预冷的、处于轻柔搅拌中的复性缓冲液中,逐滴加入上步得到的包涵体溶解液。
2. 待所有包涵体溶解液都加完后,将包涵体蛋白复性溶液用孔径为 0.22 μ m 注

射器式滤膜过滤，除去包涵体（直径一般在 0.5-0.8 μm ）和大的聚合物。

3. 将得到的溶液用于活性检测或离子交换柱层析和分子筛层析。

技术资料

包涵体



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 0.5-1 μm ，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。