

天
净
沙
系
列

CAT#: 220966-2

常温运输及保存，有低温成分

BINGENE

大量包涵体纯化试剂盒

使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: www.bingene.com; 电话: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

<p>产品及特点</p>	<p>本产品是包涵体微量纯化试剂盒的大提升级产品，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. 本产品主要用于从大肠杆菌宿主中纯化包涵体，也能用于真菌和其他表达系统，但纯化条件（主要是细胞裂解条件需要自行优化）。 5. 对大肠杆菌宿主，本手册提供高压裂解和酶学裂解两种破碎细菌，超声打断DNA的实验方案。 6. 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。 7. 本产品足够2次纯化，每次可以处理5升菌液。 																								
<p>规格及成分</p>	<p>本产品使用大纸盒包装</p> <table border="1" data-bbox="443 1010 1469 1440"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>编号</th> <th>规格</th> <th>包装材料</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>包涵体纯化溶液 A</td> <td>220966a</td> <td>100 mL</td> <td>100 mL 本色瓶</td> </tr> <tr> <td>包涵体纯化溶液 B (包涵体洗涤液)</td> <td>220966b</td> <td>250 mL×2</td> <td>250 mL 本色瓶</td> </tr> <tr> <td>包涵体溶解液</td> <td>220966c</td> <td>100 mL</td> <td>100 mL 本色瓶</td> </tr> <tr> <td>溶菌酶 (蛋白级, 20 KU/mg)</td> <td>210808</td> <td>11g 干粉</td> <td>10 mL 本色瓶</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>220966sc</td> <td>1 份</td> <td>无</td> </tr> </tbody> </table>	成份	编号	规格	包装材料	包涵体纯化溶液 A	220966a	100 mL	100 mL 本色瓶	包涵体纯化溶液 B (包涵体洗涤液)	220966b	250 mL×2	250 mL 本色瓶	包涵体溶解液	220966c	100 mL	100 mL 本色瓶	溶菌酶 (蛋白级, 20 KU/mg)	210808	11g 干粉	10 mL 本色瓶	使用手册	220966sc	1 份	无
成份	编号	规格	包装材料																						
包涵体纯化溶液 A	220966a	100 mL	100 mL 本色瓶																						
包涵体纯化溶液 B (包涵体洗涤液)	220966b	250 mL×2	250 mL 本色瓶																						
包涵体溶解液	220966c	100 mL	100 mL 本色瓶																						
溶菌酶 (蛋白级, 20 KU/mg)	210808	11g 干粉	10 mL 本色瓶																						
使用手册	220966sc	1 份	无																						
<p>运输及保存</p>	<p>常温运输和保存（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</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升的菌液到干净的、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。

二、高压破碎法 (French Press) +超声法裂解细菌 (推荐方法)

1. 按每克细菌湿重加入 3 mL 包涵体纯化溶液 A 重悬细胞, 1-5L 的菌液得到的细菌沉淀一般是 3-15g, 故需要加入 9-45mL 包涵体纯化溶液 A。加入后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。
2. 留少量样品做未裂解对照, 剩余得样品通过压力为 16000-18000 lb/in² 的高压细胞破碎仪裂解, 收集的细胞裂解液需放冰上, 显微镜下检查裂解前和裂解后完整细菌得数量, 反推出裂解细菌的比例。
3. 重复上步操作一次或多次, 直到在显微镜下观察不到或只能观察到非常少的完整细菌。
4. 一般经过多次高压细胞破碎的裂解液不会非常粘稠 (DNA 被打断)。如果还是非常粘稠, 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打断 DNA, 工作状态为 50% (开 0.5 秒, 关 0.5 秒), 直到不再粘稠为止。此进行此操作时, 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、酶法+超声法 (在没有高压破碎仪器时的候选方法)

5. 按每克细菌湿重加入 3 mL 包涵体纯化溶液 A 重悬细胞, 1-5L 的菌液得到的细菌沉淀一般是 3-15g, 故需要加入 9-45mL 包涵体纯化溶液 A。加入后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。
6. 在细菌悬浮液中加入溶菌酶干粉, 使其终浓度为 120mg/mL (45mL 加 5.4g), 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。最好在显微镜下检查细菌是否充分裂解。
7. 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打断 DNA, 工作状态为 50% (开 0.5 秒, 关 0.5 秒), 一般需要 5 分钟。具体可以根据溶液粘稠度决定。此进行此操作时, 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。

四、包涵体纯化

8. 将超声处理后的细胞裂解液转移到离心瓶中，7000g 4℃下高速离心 60 分钟（注意：转子不同 7000g 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。
9. 将沉淀（主要由包涵体构成）悬浮在预冷的包涵体纯化溶液 B 中。每克细菌需要 5 mL 包涵体纯化溶液 B，1 升细菌的湿重约 3 克，大约需要 15 mL，用玻璃棒或匀浆器搅拌混匀后室温放置 5 分钟。
10. 7000g 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。
11. 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。本试剂盒提供的包涵体纯化溶液 B 足够一次 5 升规模的提取洗 3 次，如需更多包涵体纯化溶液 B 请单独购买。
12. 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。
13. 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。

五、包涵体的溶解

14. 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。注意：包涵体溶解液含

	<p>6M 盐酸胍，溶解蛋白能力强于含 8M 尿素的溶解液，但 SDS-PAGE 时不能直接上样。客户可用自备的尿素配制 8-10 M 尿素的溶液（尿素溶液不稳定，所以不能长期放置）溶解包涵体，得到的溶解液可以直接用于 SDS-PAGE 或后续纯化。但其溶解能力弱于盐酸胍。</p> <p>15. 室温放置 1 小时使蛋白质充分溶解。</p> <p>16. 7000g 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。含溶解蛋白的上清脱盐后，可以进行 SDS-PAGE 电泳，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。</p> <p>17. 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。</p>
<p>关联产品</p>	<p>包涵体溶解和复性试剂盒</p>