

天
净
沙
系
列

CAT#: 220968-5

常温运输及保存，有低温成分

BINGENE

中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

产品及特点	本产品是微量包涵体微量纯化试剂盒的中量提取升级产品，用于中量，快速的从大肠杆菌宿主细胞中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. 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）。 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. 本手册提供通过酶法裂解细胞和打断 DNA 的方案，反应更加温和。 6. 得到的包涵体可以用于重折叠。 7. 本产品足够 5 次中量纯化，每次可以处理 30-50mL 菌液，																															
规格及成分	本产品使用大纸盒包装 <table><tr><th>成份</th><th>编号</th><th>规格</th><th>包装材料</th></tr><tr><td>包涵体纯化溶液 A</td><td>220968a</td><td>25 mL</td><td>30 mL 本色瓶</td></tr><tr><td>包涵体纯化溶液 B (包涵体洗涤液)</td><td>220968b</td><td>250 mL</td><td>250 mL 本色瓶</td></tr><tr><td>包涵体溶解液</td><td>220968c</td><td>25 mL</td><td>30 mL 本色瓶</td></tr><tr><td>溶菌酶 (蛋白级, 20 KU/mg)</td><td>210808</td><td>3 g (干粉)</td><td>10 mL 本色瓶</td></tr><tr><td>Benzonase (1U/uL)</td><td>220969</td><td>125 uL</td><td>0.5 mL 蓝盖管</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>220968sc</td><td>1 份</td><td>无</td></tr></table>				成份	编号	规格	包装材料	包涵体纯化溶液 A	220968a	25 mL	30 mL 本色瓶	包涵体纯化溶液 B (包涵体洗涤液)	220968b	250 mL	250 mL 本色瓶	包涵体溶解液	220968c	25 mL	30 mL 本色瓶	溶菌酶 (蛋白级, 20 KU/mg)	210808	3 g (干粉)	10 mL 本色瓶	Benzonase (1U/uL)	220969	125 uL	0.5 mL 蓝盖管	使用手册	220968sc	1 份	无
成份	编号	规格	包装材料																													
包涵体纯化溶液 A	220968a	25 mL	30 mL 本色瓶																													
包涵体纯化溶液 B (包涵体洗涤液)	220968b	250 mL	250 mL 本色瓶																													
包涵体溶解液	220968c	25 mL	30 mL 本色瓶																													
溶菌酶 (蛋白级, 20 KU/mg)	210808	3 g (干粉)	10 mL 本色瓶																													
Benzonase (1U/uL)	220969	125 uL	0.5 mL 蓝盖管																													
使用手册	220968sc	1 份	无																													
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： 一次中量提取需要 5 mL 包涵体纯化溶液 A，用前按每 mL 加入 120mg 溶菌酶的比例加入所需量的溶菌酶干粉并摇晃溶解待用。溶菌酶的溶液非常容易衰变，所以最好现配现用，没用完的只能在-20℃放一周。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，则需要在包涵体纯化溶液 A 中新鲜加入自备的蛋白酶抑制剂混合物。																															

一. 细胞裂解和包涵体的纯化:

1. 在蛋白诱导期结束时, 转移 30-50 mL 菌液到一个干净的塑料离心管中。
2. 7,000 rpm 室温离心 3 分钟, 小心弃上清。
3. 加入 5 mL 含 120mg/mL 溶菌酶的包涵体纯化溶液 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, 一般需要 1 小时。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, 需要重复冻融步骤, 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. 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 的包涵体纯化溶液 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 的包涵体纯化溶液 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 (包涵体纯化溶液 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

14. 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。
 15. 室温放置 1 小时使蛋白质充分溶解。
-

	16. 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。脱盐处理上清后进行 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。注意：包涵体溶解液含 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，需要先脱盐。客户也可以用自备尿素配制 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 电泳。但其溶解能力弱于盐酸胍。 17. 得到的脱氧后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、核酸酶 Benzonase 等外源蛋白质，在 SDS-PAGE 分析时可能有额外条带出现。
关联产品	微量包涵体纯化试剂盒