天净沙系列

CAT#：220967c2

常温运输，4℃保存

天净沙

包涵体溶解液 2

Inclusion Body Solution 2

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

包涵体（Inclusion Body）是指超表达的蛋白在宿主细胞胞浆内（如果超表达的是胞浆蛋白）或膜间内（如果超表达的是分泌蛋白）凝集形成的无活性的固体颗粒。包涵体形成的主要原因是在重组蛋白的表达过程中缺乏某些蛋白折叠辅助因子，或环境不适导致无法形成正确的蛋白质次级键。由于包涵体主要由超表达的重组蛋白质组成，因此分离纯化包涵体是分离纯化具有活性的重组蛋白的第一步。本产品就是一种包涵体溶解液，本产品只适用于科研。

规格及成分

本产品使用大立盒包装

成份	编号	规格	包装材料
包涵体溶解液 2	220967c2	250 mL	250 mL 棕色瓶
使用手册	sc220967c2	1 份	无

运输及保存

常温运输，4℃保存。

自备试剂

无

使用方法

本产品只包含包涵体溶解液 2,故一至二步仅供参考,完整内容与试剂建议查看 220967 微量包涵体纯化试剂盒使用手册。

一：超声法菌

1. 在蛋白诱导期结束时，转移 1.5 mL 菌液到一个干净的塑料离心管中。最好同时用不加诱导物的细菌做平行对照实验。
2. 12,000×g 室温离心 1 分钟，小心弃上清。沉淀（约 10 mg）放冰上待用或放-80℃保存。
3. 加入 250 μL 冰浴的包涵体纯化溶液 A，冰上超声裂解菌体直到在显微镜下看见绝大多数细胞破裂。超声参数需根据仪器型号自行摸索，但裂解物必须不粘稠，否则不容易沉淀包涵体。
4. 直接进入第 14 步。

二：酶法裂菌

5. 一次微量提取需要 250 μL 包涵体纯化溶液 A，用前取包涵体纯化溶液 A，按每 mL 加入 120 mg 溶菌酶的比例加入所需量的溶菌酶并摇晃溶解待用。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。
6. 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，但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。

	7. 在蛋白诱导期结束时，转移 1.5 mL 菌液到一个干净的塑料离心管中。最好同时用不加诱导物的细菌做平行对照实验。 8. 12,000×g 室温离心 1 分钟，小心弃上清。 9. 加入 250 μL 含溶菌酶的包涵体纯化溶液 A 重悬细胞。 10. 室温放置 20 分钟裂解细菌，其间可以用手轻弹离心管混匀。 11. -20℃冷冻至凝固。注意：一定要凝固到细菌溶液变成固体为止。 12. 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，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。 13. 加入 1 μL Benzonase 溶液(1 U/μL)，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，否则还需要延长保温时间。 14. 12,000×g 4℃离心 5 分钟，留存上清作为 SDS-PAGE 的对照样品一。 15. 将沉淀（包涵体）悬浮在 1 mL 的包涵体纯化溶液 B 中，室温放置 5 分钟。 16. 12,000×g 4℃离心 10 分钟，留存上清作为 SDS-PAGE 的对照样品二。 17. 将沉淀（包涵体）悬浮在 1 mL 的包涵体纯化溶液 B 中，室温放置 5 分钟。 18. 12,000×g 4℃离心 10 分钟，留存上清作为 SDS-PAGE 的对照样品三。本产品提供的包涵体纯化溶液 B 足够两次洗涤(两次洗涤一般可得到足够纯净的包涵体)。如果需要更多洗涤，用户需要单独购买包涵体洗涤液（溶液 B）。 19. 沉淀为纯化的包涵体，可以长期放置在冰箱待用或直接用于包涵体溶解。 **三：包涵体的溶解：** 20. 在包涵体沉淀中加入 250 μL 包涵体溶解液 2，用枪头充分吹打后漩涡震荡室温放置 1 小时使蛋白质充分溶解。脱盐后可以进行 SDS-PAGE 电泳。注意：包涵体溶解液 2 含 8 M 尿素（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。 21. 20，000×g 4℃离心 20 分钟，小心收集上清，保留不溶性沉淀（未能溶解的包涵体）。上清脱盐后进行 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 2 的用量。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。 22. 所得蛋白质溶液可以用于复性等试验。用户可本公司购买包涵体复性套装。
关联产品	中量包涵体纯化试剂盒