天净沙系列

CAT#：220704a

常温运输和保存

天净沙

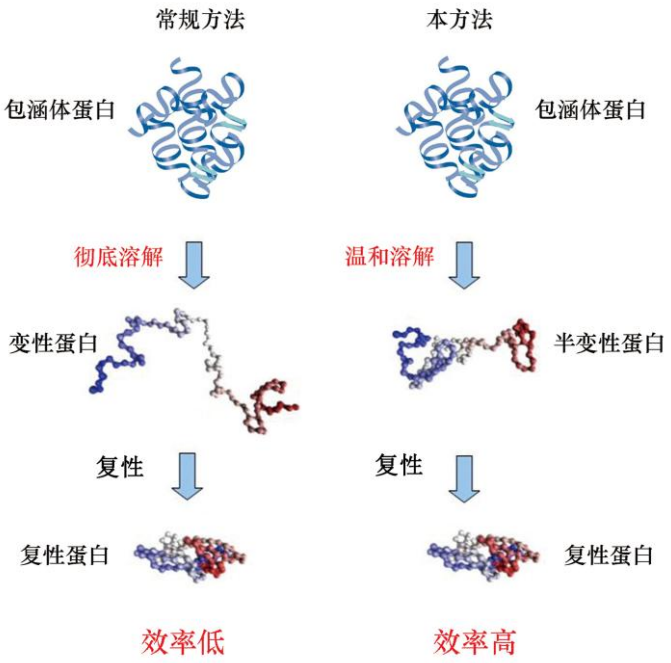
包涵体洗涤液

Inclusion Body Wash Buffer

共享使用手册 V1.0

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

产品特点	本产品是包涵体蛋白溶解及复性试剂盒的成分之一。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、质粒 DNA、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。包涵体可以避免蛋白酶对表达蛋白的降解，其形成降低了胞内表达蛋白的浓度，故有利于表达量的提高。通过 *E.coli* 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。本公司基于包涵体中的重组蛋白质已经完成了部分折叠的事实，开发了此款温和溶解-复性试剂盒，它跟常规方法比较如下：  它具有下列特点： 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，释放出其中没有彻底变性的蛋白质。 3. 提供 10 种不同的溶解液，用户需要进行小量筛选，从中筛选出最适合自己蛋白材料的一种。用户可以另购选中的任何一种进行大规模操作。 4. 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。 5. 本产品只包含包涵体洗涤液，不包含其他试剂。 6. 本产品只可用于科研。

规格及成分

本产品使用大立盒包装

成分	编号	规格	包装
包涵体洗涤液	220704a	250 mL	250 mL 本色瓶
使用手册	220704sc	1 份	1 份

运输及保存

常温运输和保存，有效期一年。

自备试剂

去离子水、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、0.22 μm 注射器式滤膜、包涵体蛋白溶解及复性试剂盒（编号：220704）

使用方法

一、包涵体的洗涤（用常规方法得到的包涵体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。）

1. 将 10 mg 包涵体沉淀溶解在 5 mL 包涵体洗涤液中，超声波处理 8 次或充分吹打混匀得到包涵体悬液。可以适当预留此步所得 30 μL 包涵体悬液作为 SDS-PAGE 电泳对照。其余的在 4℃ 12000×g 离心 20 分钟，弃上清留包涵体沉淀。
2. 重复上面的洗涤步骤 3 次，每次预留 30 μL 包涵体悬液作为电泳对照。
3. 将包涵体沉淀溶解在 1 mL 包涵体洗涤液中，超声波处理 8 次或充分吹打混匀再得包涵体悬液。
4. 检查包涵体的纯度：将上步所得到的包涵体悬液和前几步得到的包涵体悬液一起用于 SDS-PAGE 电泳，检查每次洗涤去除杂带的情况。
5. 检查包涵体的浓度：用自备的 BCA 蛋白检测试剂盒测试第 4 步得到的包涵体悬液的蛋白质浓度。
6. 将第 4 步得到的包涵体悬液的蛋白质浓度调到 5-10 mg/mL（如果测得值低于此范围，则重复本实验，只是离心后用更少量的洗涤液溶解；如果测得值高于此范围，则用适量洗涤液稀释），然后将包涵体悬液均分到 10 个 1.5 mL 塑料离心管中，每管 100 μL。
7. 4℃ 12000×g 离心 20 分钟后弃上清。所得沉淀即纯化的、待用的包涵体。

二、溶解包涵体的最佳溶解液的确定

8. 标记上步所得到的 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：准确记录离心管编号和加入溶解液编号的对应关系。
9. 充分振荡后，室温放置 30 分钟。
10. 450 nm 检测浑浊度并记录下数据。
11. 4℃ 12000×g 离心 10 分钟后收集上清，此溶液含有溶解的或部分溶解的包涵体蛋白质。

	12. 用 0.22 μm 注射器式滤膜过滤上步所得溶液。280 nm 检测其光吸收。 13. 溶解液溶解包涵体蛋白的能力跟包涵体溶液浊度跟成反比，跟溶解液 OD280 光吸收成正比。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（OD 值最高者有最大溶解包涵体蛋白的能力），并将选用此溶解液用于下面的复性实验。本试剂盒提供的 10 种包涵体溶解液均可以另购。 **三．包涵体蛋白的复性** 14. 在 2.5 mL 4℃预冷的、处于轻柔搅拌中的包涵体蛋白质复性液（本试剂盒提供）中，逐滴加入上步得到的 OD280 数值最高的包涵体溶解液。 15. 待所有包涵体溶解液都加完后，将包涵体蛋白复性混合液用孔径为 0.22 μm 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。 16. 将得到的复性蛋白溶液（过滤穿透液）直接用于活性检测或离子交换柱层析和分子筛层析等实验，不需要透析和脱盐。
关联产品	微量包涵体纯化试剂盒