天净沙系列

CAT#：220967-20

常温运输和保存、有低温成分

天净沙

微量包涵体纯化试剂盒

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。本产品就是用于快速地从大肠杆菌宿主中提取高质量的包涵体的试剂盒，它具有下列特点：

1. 操作简单快速，整个过程只要三十分钟左右。
2. 微量纯化，可以在 1.5mL 离心管中完成。
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，使重组蛋白所占比重达到 60%以上。
4. 主要用于细菌表达系统，也可用于真菌和真核表达系统，但用户需要自行摸索条件。
5. 可以选择盐酸胍和尿素两种蛋白溶解方式。
6. 得到的包涵体溶解液可以用于重折叠、SDS-PAGE 或其他纯化处理。
7. 本产品足够 20 次微量纯化。

规格及成分

本产品使用小扁盒包装

成份	编号	规格	包装材料
微量包涵体纯化溶液 A	220967a	5 mL	5 mL 本色瓶
微量包涵体纯化溶液 B	220967b	50 mL	60 mL 本色瓶
包涵体溶解液	220967c	5 mL	5 mL 本色瓶
溶菌酶 （蛋白级，20 KU/mg）	210808	600 mg（干粉）	2.0 mL 本色管
Benzonase 溶液（1U/uL）	220969	20 uL	0.5 mL 蓝盖管
使用手册	220967sc	1 份	无

运输及保存

常温运输和保存、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

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 rpm 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 uL 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 250uL 包涵体纯化溶液 A，用前取包涵体纯化溶液 A，按每 mL 加入 120mg 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 rpm 室温离心 1 分钟，小心弃上清。
9. 加入 250 uL 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 uL Benzonase 溶液(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，否则还需要延长保温时间。
14. 12,000 rpm 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 rpm 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 1mL 的包涵体纯化溶液 B 中，室温放置 5 分钟。
18. 12,000 rpm 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 uL 包涵体溶解液，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。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。 21. 20，000g 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