天净沙系列

CAT#:231119

常温运输和保存

天净沙

细菌鞭毛蛋白纯化试剂盒

Bacterial Flagellin Protein Purification Kit

使用手册 V1.02

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

细菌鞭毛蛋白可以作为疫苗佐剂，具有重要的应用价值。传统的纯化细菌鞭毛蛋白的方法多需要使用超速离心或者层析交换，步骤非常繁琐，使用不便，为此本公司开发了不需要超速离心和层析交换的细菌鞭毛蛋白快速纯化试剂盒，它具有下列特点：

1. 只有洗涤和沉淀两步，简单快捷。
2. 所得细菌鞭毛蛋白纯度高，完整性好。
3. 回收效率高，一般能得到相当于总蛋白量 6%的鞭毛蛋白。
4. 可用于 *Escherichia coli*，*Salmonella* Typhimurium，*Salmonella* Typhi，*Citrobacter freundii* 等细菌。
5. 本产品需要冷冻高速离心机。
6. 本产品足够 20 次细菌鞭毛蛋白纯化，每次可以处理 1L 饱和菌液。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用大扁盒包装

成分	编号	规格	包装
10×细菌鞭毛蛋白纯化洗涤液	231119a	250 mL	250 mL 本色瓶
细菌鞭毛蛋白纯化沉淀剂	231119b	250 g×2	250 mL 本色瓶
使用手册	231119sc	1 份	无

运输及保存

常温运输和保存，有效期一年。

自备试剂

超纯水、PBS 缓冲液（pH 7.4），透析耗材。

使用方法

1. 实验前取将适量的 10×细菌鞭毛蛋白洗涤液用自备的超纯水稀释 10 倍后得到 1×细菌鞭毛蛋白洗涤液，放冰上待用。
2. 收集 1 L 过夜培养的细菌饱和培养液（OD600 在 0.6 左右即可），5000×g 室温离心 10 分钟后弃上清。
3. 在细菌沉淀中加入 200 mL 自备的 PBS 缓冲液（pH 7.4），充分混匀得到细菌重悬液。
4. 5000×g 室温离心 10 分钟，小心弃除上清。
5. 重复 3-4 步一次。
6. 在细菌沉淀中加入 50 mL 1×细菌鞭毛蛋白洗涤液，充分混匀得到细菌重悬液。
7. 将细菌悬浮液转移到 100 mL 烧杯中（或 100 mL 平底塑料平中）并放入磁

	力搅拌子（搅拌子大小应适中，需保证搅拌充分），再将 100 mL 烧杯放到一个大烧杯（如 2 L 烧杯）中间，周边入碎冰固定小烧杯，然后将装有小烧杯的大烧杯放在磁力搅拌器上搅拌 30 分钟。 8. 取出搅拌子，将细菌重悬液转移到离心管中，10000×g 离心 20 分钟，小心收集约 50 mL 含有细菌鞭毛蛋白的上清液。 9. 用 pH 试纸检测溶液的 pH。如果 pH 跟鞭毛蛋白的等电点相差超过 0.5，最好用 1M NaOH 或 1 M 盐酸将其调到不超过 0.5。细菌鞭毛蛋白的 pH 一般在 4.5-5.5 之间，具体多少根据物种不同而不同，可以根据其氨基酸序列在线计算或参考相关文献。 10. 用 NanoDrop 或类似仪器测定上清液中的蛋白浓度，用于后续计算回收率。 11. 将上清液转移到一个 100 mL 干净烧杯中并放入磁力搅拌子，再将 100 mL 烧杯放到一个大烧杯（如 2 L 烧杯）中间，周边加入碎冰固定小烧杯，然后将装有小烧杯的大烧杯放在磁力搅拌器上缓慢搅拌。搅拌中加入细菌鞭毛蛋白纯化沉淀剂 24.7 g（用前最好用研钵磨成细粉在 45 分钟的时间内分批少量缓慢加入，每次加入 5 g 左右，搅拌溶解后再加入下一批，避免一次全部加入使得沉淀剂浓度过高让鞭毛蛋白变性失活），待最后一批沉淀剂加入后继续搅拌 30 分钟。最后静置至少 45 分钟，期间细菌鞭毛蛋白将形成沉淀。 12. 取出搅拌子，将溶液转移到干净离心管中，4℃下 10000×g 离心 10 分钟。 13. 所得沉淀为细菌鞭毛蛋白，小心转移上清到新的离心管中（在确认得到鞭毛蛋白之前不要丢弃此溶液。通过测定其蛋白浓度，并跟第 10 步所得浓度比较，即可粗略估计出蛋白沉淀的质量）。 14. 用一定体积 pH 7.4 的 PBS 缓冲液溶解蛋白沉淀。 15. 由于所得细菌鞭毛蛋白含盐，所以用户需要采用过柱除盐法或透析除盐法除盐。由于细菌鞭毛蛋白分子量在 15-40 Kd，所以需要据此选择合适截留孔径的透析袋（3.5 kDa 或 7 kDa 孔径），在合适透析液（根据后续实验确定，如无特殊需求可用 PBS 缓冲液，pH 7.4）中进行过夜透析。本试剂盒不含相关试剂。
关联产品	His-标记蛋白微量纯化试剂盒