天净沙系列

CAT#：220966

常温运输及保存，有低温成分

天净沙

大量包涵体纯化试剂盒

Large-Scale Inclusion Body Purification Kit

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

本产品是包涵体微量纯化试剂盒的大提升级产品，用于大量，快速的提取高质量的包涵体。它具有下列特点：

1. 大量提取，1 次可处理多达 5 升的菌液，相当于 50 次中量提取。
2. 适合制备级别的包涵体纯化，需在 50 mL 以上的离心管或离心瓶中完成。
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，使重组蛋白在包涵体中所占比重达到 60%以上。
4. 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）。
5. 对大肠杆菌宿主，本手册提供高压裂解和酶学裂解两种破碎细菌，超声打断 DNA 的实验方案。
6. 得到的包涵体可以用于重折叠，也可以用于凝胶层析和动物免疫。
7. 本产品足够 2 次纯化，每次可以处理 5 升菌液。
8. 本产品只可用于科研。

规格及成分

本产品使用大扁盒包装

成份	编号	规格	包装
包涵体纯化溶液 A	220966a	100 mL	125 mL 本色瓶
包涵体纯化溶液 B （包涵体洗涤液）	220966b	250 mL×2	250 mL 本色瓶
包涵体溶解液	220966c	100 mL	125 mL 本色瓶
溶菌酶 （蛋白级，20 KU/mg）	210808	11 g 干粉	30 mL 本色瓶
使用手册	220966sc	1 份	无

运输及保存

常温运输和保存（溶菌酶需要-20℃保存，包涵体溶解液可以室温保存），有效期一年。

自备试剂

如果得到的重组蛋白确有降解则需要自备蛋白酶抑制剂混合物

使用方法

一、细胞沉淀

1. 转移 1-5 升的菌液到干净的、预称重量的塑料离心瓶中。如果离心瓶体积不够大，可以分多次反复离心收集。
2. 5,000 g（相当于 Sorvall GSA 转头 5500 rpm）4℃离心 15-30 分钟，小心弃上清。
3. 复称重量，差值就是细菌的湿重。1 升的过夜培养的大肠杆菌湿重一般为 3 克，所以 1-5 升菌液一般能得到 3-15 克细菌。注意：后续操作的很多溶液都是按此步得到得细胞湿重添加。

4. 细胞沉淀可以立即使用或存放在-80℃待用。

二、高压破碎法（French Press）+超声法裂解细菌（推荐方法）

1. 按每克细菌湿重加入 3 mL 包涵体纯化溶液 A 重悬细胞，1-5L 的菌液得到的细菌沉淀一般是 3-15g，故需要加入 9-45mL 包涵体纯化溶液 A。加入后可以用玻璃棒搅拌或用 Waring 捣碎机匀浆（如果细菌湿重超过 10 克）使细菌悬浮，直到检测不到成块的细胞为止。
2. 留少量样品做未裂解对照，剩余得样品通过压力为 16000-18000 lb/in^2 的高压细胞破碎仪裂解，收集的细胞裂解液需放冰上，显微镜下检查裂解前和裂解后完整细菌得数量，反推出裂解细菌的比例。
3. 重复上步操作一次或多次，直到在显微镜下观察不到或只能观察到非常少的完整细菌。
4. 一般经过多次高压细胞破碎的裂解液不会非常粘稠（DNA 被打断）。如果还是非常粘稠，将细胞裂解液置于冰浴中，用超声破碎仪满功率下超声处理打断 DNA，工作状态为 50%（开 0.5 秒，关 0.5 秒），直到不再粘稠为止。此进行此操作时，最好将细胞裂解液放冰上并用磁力搅拌器搅拌，否则产生的热量会使包涵体蛋白变性，在纯化中丢失。

三、酶法+超声法（在没有高压破碎仪器时的候选方法）

5. 按每克细菌湿重加入 3 mL 包涵体纯化溶液 A 重悬细胞，1-5L 的菌液得到的细菌沉淀一般是 3-15g，故需要加入 9-45mL 包涵体纯化溶液 A。加入后可以用玻璃棒搅拌或用 Waring 捣碎机匀浆（如果细菌湿重超过 10 克）使细菌悬浮，直到检测不到成块的细胞为止。
6. 在细菌悬浮液中加入溶菌酶干粉，使其终浓度为 120mg/mL（45mL 加 5.4g），搅拌混匀后 37℃放置 30 分钟裂解细菌，其间不时需要用玻璃棒混匀。细菌释放出的 DNA 将使裂解物变得十分粘稠。如果不粘稠，说明裂解不充分，需要继续裂解，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. 将细胞裂解液置于冰浴中，用超声破碎仪满功率下超声处理打断 DNA，工作状态为 50%（开 0.5 秒，关 0.5 秒），一般需要 5 分钟。具体可以根据溶液粘稠度决定。此进行此操作时，最好将细胞裂解液放冰上并用磁力搅拌器搅拌，否则产生的热量会使包涵体蛋白变性，在纯化中丢失。

四、包涵体纯化

8. 将超声处理后的细胞裂解液转移到离心瓶中，7000g 4℃下高速离心 60 分钟（注意：转子不同 7000g 对应的离心速度不同），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）悬浮在预冷的包涵体纯化溶液 B 中。每克细菌需要 5 mL 包涵体纯化溶液溶液 B，1 升细菌的湿重约 3 克，大约需要 15 mL，用玻璃棒或匀浆器搅拌混匀后室温放置 5 分钟。
10. 7000g 4℃下高速离心 30 分钟，沉淀将出现三层，最下面的是未彻底破裂的细胞碎片，其上是包涵体，最上层的松软沉淀是细胞壁和细胞外膜。如果处理过程中使用过溶菌酶，则此层较薄。小心收集上清，可以作为包涵体第一次洗涤的对照样品。
11. 重复第 9-10 步直到上清变清和最上层细胞壁和细胞外膜松软沉淀消失，此过程一般需要重复洗涤 2 次（共 3 次洗涤），小心收集上清作为包涵体第二次洗涤和第三次洗涤的对照样品。本试剂盒提供的包涵体纯化溶液 B 足够一次 5 升规模的提取洗 3 次，如需更多包涵体纯化溶液 B 请单独购买。
12. 上步得到的沉淀即为包涵体，其中重组蛋白一般占 60%重量，其余 40%为其他蛋白质。此沉淀可以长期放置在-80℃冰箱待用，也可以直接用于免疫动物制备抗体，还可以直接进入下面得包涵体的溶解步骤。
13. 估计重组蛋白的产率：首先需要通过预实验知道重组蛋白的表达水平，如果表达水平为 1%，则 1 克湿重的细菌中将含有 1 mg 重组蛋白质。此法得到的重组蛋白质的回收率一般在 75%，即 1mg 重组蛋白质能得到 0.75 mg，丢失 0.25mg。

五、包涵体的溶解

14. 在室温下，将包涵体溶解液加入到包涵体沉淀中，用枪头充分吹打后漩涡震荡。如果需要将溶解的包涵体直接用于凝胶过滤层析进一步纯化，则按每克原始细胞湿重加入 1 mL 包涵体溶解液，重组蛋白的浓度约为 4-5 mg/mL；如果需要将溶解的包涵体直接用于蛋白质折叠，则按每克原始细胞湿重加入 3 mL 包涵体溶解液，重组蛋白的浓度约为 1-2 mg/mL；注意：包涵体溶解液低温放置会产生沉淀，必须 45-65℃溶化并混匀后才能使用。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。
15. 室温放置 1 小时使蛋白质充分溶解。
16. 7000g 4℃离心 60 分钟(转速需要根据离心机转子的大小换算)，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。含溶解蛋白的上清脱盐后，可以进行 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。 17. 将上清（溶解的包涵体）分成 10-20mL 一份，放于塑料离心管中（不要超过离心管容量的 70%）置-80℃长期保存或直接用于复性等试验。由于不同的蛋白质有不同的最佳复性条件，需要用户自己摸索。包涵体纯化过程中引入了溶菌酶，在 SDS-PAGE 分析时可能有额外条带出现。
关联产品	包涵体溶解和复性试剂盒