**包涵体蛋白提取试剂盒 Inclusion Body Protein Extraction Kit MBP0912**

**MAG2460**

**Technical literature is available at:** [**www.mesgenbio.com**](http://www.mesgenbio.com)**. E-mail MesGen Technical Services if you have questions on use of this system: tech@mesgenbio.com**

****

* **产品简介**

在大肠杆菌中表达过量的外源蛋白通常会形成包涵体，该试剂盒裂解细菌后，采用一定的去污剂洗涤包涵体，去除大部分包裹在内的细胞组分，包括细胞膜，DNA, RNA,核糖体和其他细菌蛋白组分等，最终通过高浓度变性剂溶解包涵体。溶解的蛋白质可用于后续实验，如重折叠，SDS-PAGE，Western Blots，2-D凝胶电泳酶分析。该试剂盒可用于10 preps（10X 1g湿重大肠杆菌）或10X 1 L大肠杆菌培养物（OD600=1）。大包装试剂盒的提取量按比例自行计算。

* **试剂盒组成**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **组成** | **10g Bacteria** | **50g Bacteria** |
| **Cell lysis buffer I** | 30ml | 150ml |
| **Cell lysis buffer II** | 30ml | 150ml |
| **IB solubilization buffer I** | 50ml | 250ml |
| **IB solubilization buffer II** | 500ml | 5×500ml |
| **Deoxycholic acid** | 1ml | 5ml |
| **2X SDS loading buffer** | 0.5ml | 2.5ml |
| **100mM PMSF** | 0.3ml | 1.5ml |
| **Lysozyme** | 1ml | 5ml |
| **DNase I** | 0.3ml | 1.5ml |
| **KOH** | 5ml | 25ml |

* **操作方法**

1. 在预先称重的离心瓶里，将1 L表达目的蛋白的大肠杆菌细胞培养物在4°C，5,000 g离心15分钟。

2. 去除上清液并确定大肠杆菌沉淀的重量。每克（湿重）大肠杆菌，加入3 ml **Cell lysis buffer I**，通过温和的涡旋或用抛光的玻璃棒搅拌重悬，此操作应保持在4°C温度下。

3. 每克大肠杆菌，加入20 μl **100mM PMSF**和100μl **Lysozyme**，将悬浮液在37°C下搅拌20分钟。

4. 继续搅拌，每克大肠杆菌加入100 μl **Deoxycholic acid**。

5. 将悬浮液保存在37°C，并用玻璃棒偶尔搅拌一次。当裂解液变粘时，每克大肠杆菌加入30 ul **DNase I**。

6. 将裂解液放置在室温下，直至不再粘稠（约30分钟）。

7. 纯化和洗涤包涵体。

7.1.在离心管中，将细胞裂解物在4°C，12,830 g离心15分钟。

7.2.去除上清液，在4°C环境下，预估沉淀体积，加入9倍沉淀体积**Cell lysis buffer II**重悬。

7.3.将悬浮液在室温下放置5分钟。

7.4. 将离心管中的悬浮液在4°C环境下，12,830 g离心15分钟。

7.5. 去除上清液并保留用于下一步。将沉淀物重悬于100 μl的H2O中。

7.6. 各取10 μl上清液和悬浮颗粒样品，将样品用**2X SDS loading buffer**稀释成20 μl进行SDS-PAGE电泳，验证目的蛋白存在位置。

8. 溶解包涵体：

8.1.将步骤7中的重悬浮颗粒放入离心管中在4°C，以12,830 g离心15分钟，然后将沉淀物悬浮于1ml的**IB solubilization buffer I**中（使用前加入10 μl **100mM PMSF**）。

*备注：为保证最佳的蛋白保护效果，亦推荐蛋白酶抑制剂Protease Inhibitor Cocktail 100X (Cat.No.MG2284)*。

8.2.室温下保存1小时。

8.3.将该溶液加入到9倍体积的**IB solubilization buffer II**中，并在室温下孵育混合物30分钟。取一点小样在pH试纸上检查pH值是否保持在10.7，如有差别可以用**KOH**调整。

8.4.用12 M HCl将溶液的pH调至8.0，然后至少在室温下保存30分钟。

8.5.将溶液倒入离心管中在室温下以12,830 g离心15分钟。

8.6.去除上清液并保留用于下一步。将沉淀重悬于100 μl **1X SDS loading buffer**中。

8.7.分别取10 μl上清液和重悬的颗粒样品，与10 μl **2X SDS loading buffer**混合。通过SDS-PAGE分析两个样品以确定溶解度。

* **注意内容**

1. 在4°C下进行步骤1和步骤2。

2. 不同蛋白可能需要不同的步骤，成功重折叠的变性蛋白质可以完全依赖于步骤进行，几种技术如稀释，透析和凝胶色谱法可用于重折叠变性蛋白质。对其他重折叠蛋白的步骤，请参见参考文献。对于不同蛋白使用相差显微镜来检测大肠杆菌是否彻底裂解，因为完整的细胞会降低蛋白质的纯度。

3. 虽然蛋白质存在于包涵体中，但在某些情况下上清中仍然有大量的蛋白质，因此可以检测上清液。

4. 用6M盐酸胍代替尿素，可以得到更好的效果。

5. 使用GSH/GSSG系统和分子伴侣，配体，底物等小分子能够提高复性产率。

* **保存条件**

DNase I，lysozyme，2X SDS loading buffer和100mM PMSF保存在-20°C，其他组分保存在常温（如开封后建议保存在4°C），保质期12个月。

**仅供科学研究，不得用于临床治疗**