

Technical literature is available at: 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 μ l的H₂O中。
- 7.6. 各取10 μ l上清液和悬浮颗粒样品, 将样品用**2X SDS loading buffer**稀释成20 μ l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 μ l **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 μ l **1X SDS loading buffer**中。
- 8.7. 分别取10 μ l上清液和重悬的颗粒样品, 与10 μ l **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