

包涵体蛋白提取试剂盒

产品货号: 26502

产品规格: 10 g bacteria/30 g bacteria

产品简介:

该试剂盒旨在提取表达蛋白质的不溶性聚集体—包涵体蛋白和筛选克隆大肠杆菌在包涵体中表达的重组蛋白。提取过程简单快捷。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（10×1g湿重大肠杆菌）或10×1L大肠杆菌培养物（OD 600 = 1）。

产品组成:

组成	10 g bacteria	30 g bacteria	保存条件
Cell lysis buffer I	30ml	90ml	2-8°C
Cell lysis buffer II	20ml	60ml	2-8°C
Deoxycholic acid	1ml	3ml	2-8°C
10×IB solubilization buf. I	5ml	15ml	2-8°C
5×IB solubilization buf. II	100ml	300ml	2-8°C
2×SDS loading buffer	0.5ml	1.5ml	-20°C
DNase I	0.3ml	0.9ml	-20°C
Lysozyme	1ml	3ml	-20°C
KOH	5ml	15ml	2-8°C
100× Protease Inhibitor	0.3ml	1ml	-20°C

实验步骤:

1. 在预先称重的离心瓶里，将1L表达目的蛋白的大肠杆菌细胞培养物在4°C，5,000g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3ml 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4μl 100×Protease Inhibitor和80μl 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80μl 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20ul 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。
 - (1) 在离心管中，将细胞裂解物在4°C，12,830g离心15分钟。
 - (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。
 - (3) 将悬浮液在室温下放置5分钟。
 - (4) 将离心管中的悬浮液在4°C环境下，12830g离心15分钟。
 - (5) 去除上清液并保留用于下一步。将沉淀物重悬于100μl的H₂O中。
 - (6) 各取10μl上清液和悬浮颗粒样品，将每个样品用2×SDS loading buffer稀释成20μl进行SDS-PAGE电泳，以验证目的蛋白存在位置。
8. 溶解包涵体:
 - (1) 将步骤7中的重悬浮颗粒放入离心管中在4°C，以12830g离心15分钟，然后将沉淀物悬浮于1ml的1×IB solubilization buf.



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

I (用去离子水将10×IB solubilization buf. I稀释1×IB solubilization buf. I) 中 (使用前加入0.48g尿素和10μl 0.1 M PMSF或100× Protease Inhibitor)。

- (2) 室温下保存1小时。
- (3) 将该溶液加入到9倍体积的1×IB solubilization buf. II (用去离子水将5×IB solubilization buf. II稀释1×IB solubilization buf. 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。
- (4) 用12M HCl将溶液的pH调至8.0, 然后至少在室温下保存30分钟。
- (5) 将溶液倒入离心管中在室温下以12830g离心15分钟。
- (6) 去除上清液并保留用于下一步。将沉淀重悬于100μl 1×SDS loading buffer中。
- (7) 分别取10μl上清液和重悬的颗粒样品, 与10μl 2×SDS loading buffer混合。通过SDS-PAGE分析两个样品以确定溶解度。

注意事项:

1. 在4℃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。
6. 处理100×Protease Inhibitor时需要小心操作, 佩戴防护眼镜和手套, 因为其对健康有害, 毒性非常大, 对眼睛和皮肤有刺激性作用。另外本产品仅供实验室研究使用。

有效期:

24个月有效。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>