

细菌活性蛋白抽提试剂

产品货号: T15756

产品规格: 100ml/500ml

产品简介:

乐业生产的细菌活性蛋白抽提试剂是一种无需超声或高压破碎,能快速、高质量、高产量、高活性地直接裂解并抽提大肠杆菌表达的重组蛋白以及大肠杆菌自身表达的可溶性蛋白的细菌活性蛋白提取试剂。本产品非常适合快速高通量的蛋白表达和筛选。本产品不仅可以用于抽提可溶性蛋白,也可以用于洗涤去除粘附在包涵体表面的细胞碎片以获得高纯度的包涵体蛋白。需要注意的是,本产品不能溶解包涵体。

本产品经过优化,适用于BL21菌,也同样适用于DH5a、JM109以及其它类似的细菌。

本产品是一种含有特定的经过精心筛选以确保蛋白抽提效果良好的比较温和的非变性去垢剂(detergent)的缓冲液(含40mM Tris, pH8.0)。所提取的蛋白通常能很好地保持蛋白原有的结构和生物学活性,可用于多种生物化学和分子生物学用途,兼容常见下游实验操作如His或GST等标签蛋白的纯化、ELISA、Western blot、IP、酶活性检测、荧光蛋白检测等。

本产品能通过一步法快速(15min)有效地裂解细菌、抽提细菌细胞质和细胞核内的蛋白,提取过程中无需繁琐的超声或者高压破菌(French press)操作。与超声破碎法、高压破菌法和溶菌酶处理等方法相比,本产品通常能获得更高产量和更高活性的可溶性目的蛋白。

细菌活性蛋白抽提试剂裂解表达GST-EGFP的BL21(DE3)的效果可参照图1。

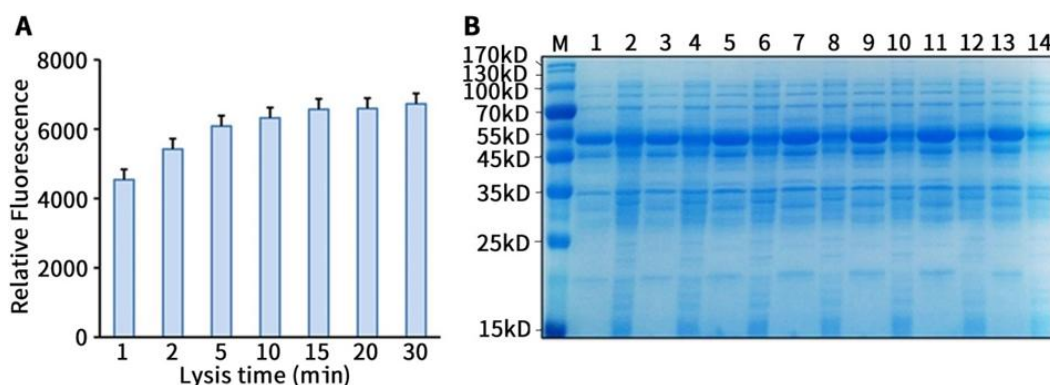


图1. 细菌活性蛋白抽提试剂对于细菌的裂解效果图。A. 表达EGFP蛋白的细菌不同裂解时间抽提产物的荧光强度。20mg表达GST-EGFP的BL21(DE3)菌体在加入1ml细菌活性蛋白抽提试剂,裂解指定时间后取上清检测荧光强度。图中可见,裂解15min时达到平台期。B. 对应A图中不同裂解时间点,蛋白在上清和沉淀中的分布情况。泳道1、3、5、7、9、11、13依次是裂解1、2、5、10、15、20和30min的上清;泳道2、4、6、8、10、12、14依次是裂解1、2、5、10、15、20和30min的沉淀。图中可见,裂解15min后,GST-EGFP在上清和沉淀的分布比例基本不变。图中数据仅供参考,实际的检测效果会因具体的实验条件不同而有所不同。

使用本产品获得的蛋白样品可用乐业生产的BCA蛋白浓度测定试剂盒或Bradford蛋白浓度测定试剂盒(去垢剂兼容型)进行定量分析。

细菌活性蛋白抽提试剂与超声破碎法裂解表达GST-EGFP的BL21 (DE3)的效果比较请参考图2。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址:郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

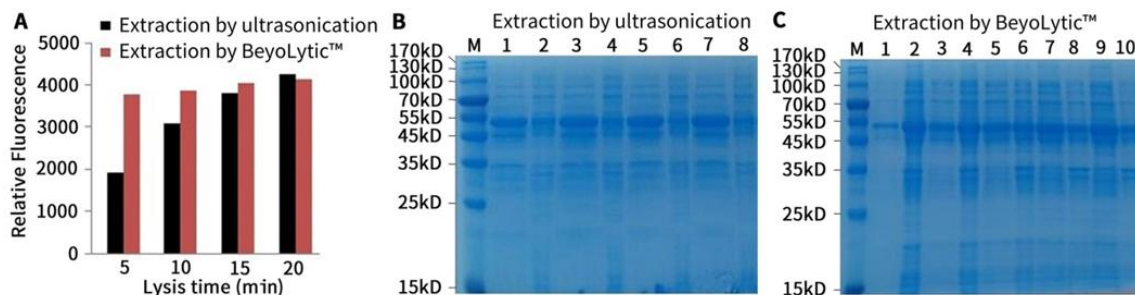


图2. 细菌活性蛋白抽提试剂与超声破碎法裂解细菌的效果比较图。A. 表达GST-EGFP的细菌用超声法和本产品裂解不同时间获得的抽提产物的荧光强度。20mg表达GST-EGFP的BL21(DE3)菌体在加入1ml细菌活性蛋白抽提试剂，裂解指定时间后取上清检测荧光强度；20mg表达GST-EGFP的BL21(DE3)菌体在加入1ml PBS，之后超声破碎指定时间后取上清检测荧光强度。B. 对应A图中使用细菌活性蛋白抽提试剂抽提的不同时间点，蛋白在上清和沉淀中的分布情况。泳道1、3、5、7依次是抽提5min、10min、15min和20min的上清；泳道2、4、6、8依次是抽提5min、10min、15min和20min的沉淀。C. 对应A图中不同超声时间点，蛋白在上清和沉淀中的分布情况。泳道1、3、5、7、9依次是抽提2min、5min、10min、15min和20min的上清；泳道2、4、6、8、10依次是抽提2min、5min、10min、15min和20min的沉淀。图中可见，细菌活性蛋白抽提试剂的抽提效果显著优于超声破碎法。图中数据仅供参考，实际的检测效果会因具体的实验条件不同而有所不同。

产品组成：

产品名称	规格	保存条件
细菌活性蛋白抽提试剂	100ml/500ml	室温

使用说明：

- 小量可溶性蛋白抽提。通过小量蛋白抽提实验来检测目的蛋白是否表达或存在，然后再进行大量的蛋白提取。
 - 按照常规方法进行重组蛋白表达菌株的培养以及目的蛋白的诱导表达。
 - 取 1.5ml OD600 为 0.5-2.0 的菌液，12,000-16,000g 4℃ 或室温离心 2min，弃上清。
 - 用 0.2-0.4ml 细菌活性蛋白抽提试剂重悬细胞，可短暂涡旋混合以充分重悬。室温孵育 15min。
 - 12,000-16,000g (16,000g 更佳) 4℃ 离心 5min。
 - 小心吸取上清，即为抽提获得的可溶性蛋白。吸取上清时触及沉淀会导致抽提产物中含有更多的杂蛋白等。
 - 通过 SDS-PAGE 或 Western blot 等方法检测目的蛋白存在于上清还是不溶性沉淀中。SDS-PAGE 电泳时，每个样品的上样量推荐为 5-15μl。
- 大量可溶性蛋白抽提。
 - 按照常规方法进行重组蛋白表达菌株的培养以及目的蛋白的诱导表达。
 - 收集 250ml OD600 约为 2.0 的菌液，5,000g 4℃ 或室温离心 10min，弃上清后可获得约 1g 的湿菌。后续可以直接用于裂解或冻存后用于裂解，通常冻存后再裂解可以获得更高的蛋白得率。但冻融对于某些蛋白的活性可能会起到负面影响。
 - 按照每 1g 湿菌加入 20-50ml 细菌活性蛋白抽提试剂(在使用前可加入适当的蛋白酶抑制剂)的比例进行抽提，用移液管反复吹打混匀。加入较少的抽提试剂可以获得较高浓度的蛋白，但抽提效率会有所下降；加入较多的抽提试剂可以获得更高的抽提效率，但蛋白浓度会相对较低。如果较易取得比较多的湿菌，推荐使用较少的抽提试剂。此外，为取得最佳结果，可加入最终浓度为 2mg/ml 的溶菌酶和 2mM 的 EDTA 以进一步改善抽提效果，可以加入最终浓度为 50U/ml 的超级核酸酶以降低粘稠度。
 - 室温孵育 15min，充分抽提蛋白。
 - 12,000-16,000g (16,000g 更佳) 4℃ 或室温离心 10min。
 - 小心吸取上清，即为抽提获得的可溶性蛋白。吸取上清时触及沉淀会导致抽提产物中含有更多的杂蛋白等。
 - 通过 SDS-PAGE 或 Western blot 等方法检测目的蛋白存在于上清还是不溶性沉淀中。SDS-PAGE 电泳时，每个



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

样品的上样量推荐为 5-15 μ l。

注意事项:

1. 可以考虑选购蛋白酶抑制剂混合物(细菌抽提用, 100 $\times$)、蛋白酶抑制剂混合物(His-Tag 蛋白纯化用, 100 $\times$) 或 PMSF (100mM) , 并添加到本产品中以抑制蛋白降解。可以考虑选购超级核酸酶, 并添加到本产品中以降低抽提产物的粘稠度。
2. 本产品采用 Tris-HCl 缓冲系统, 蛋白提取后的相关纯化操作, 可以使用相同的缓冲系统。
3. 对于特殊的菌株, 如果抽提效果不太理想, 可以考虑进行冻融处理。冻融处理通常可进一步提高产品的蛋白抽提效果。
4. 如果使用本产品抽提得到的样品需要使用金属螯合纯化柱进行纯化, 通常避免加入含 EDTA 的试剂。但乐业生产的 His-tag Purification Resin 可与 EDTA 兼容, 因而在抽提试剂中含有 EDTA 仍然可用于含有 His 标签的蛋白纯化。
5. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
6. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

保存条件:

室温保存, 2年有效。 4 $^{\circ}$ C或-20 $^{\circ}$ C可以保存更长时间。

常见问题:

1. 目的蛋白产量低。
 - a. 细菌裂解不充分。反复冻融细菌促进细胞破裂, 或者加入溶菌酶都有助于蛋白的抽提。
 - b. 样品的粘稠度太高。加入超级核酸酶或 DNase I 可降低样品的粘稠度, 有助于可溶性蛋白的抽提。
 - c. 目的蛋白降解了。加入蛋白酶抑制剂可降低目的蛋白的降解。推荐选购乐业生产的蛋白酶抑制剂混合物(细菌抽提用, 100 $\times$)、蛋白酶抑制剂混合物(His-Tag 蛋白纯化用, 100 $\times$) 或 PMSF (100mM) 。
 - d. 目的蛋白的表达水平低。可加入较高浓度的 IPTG、延长诱导时间、调整诱导温度等, 同时考虑检查构建的质粒, 或选用其它蛋白表达菌株。
 - e. 目的蛋白可能是不溶性的。检查离心后的沉淀, 确定目的蛋白是否形成了包涵体。
 - f. 蛋白抽提试剂加入量太少。适量增加蛋白抽提试剂的量。
2. 抽提的可溶性蛋白溶液浑浊不透明。
 - a. 加入的蛋白抽提试剂的量不足。适当增加抽提试剂的用量。
 - b. 细菌裂解不充分。可以尝试在蛋白抽提的时候添加溶菌酶, 添加溶菌酶后很可能会使最终的蛋白溶液变澄清。
 - c. 抽提后的蛋白样品冻存时间过长。建议在 1-2 周内使用抽提后的蛋白溶液进行后续实验。
 - d. 分离蛋白上清和沉淀时的离心力或离心时间不够。确保 14,000g 离心 15min, 或使用更大的离心力或离心更长时间。
 - e. 表达的目的蛋白发生聚集。加入甘油至终浓度为 40-50%通常可以阻止蛋白聚集和析出, 或者用硫酸铵沉淀法将目的蛋白从抽提试剂中沉淀下来, 再设法溶解。
 - f. 低温导致蛋白溶解性下降。恢复到室温, 增加蛋白溶解性可能会使溶液变澄清。这种情况下增加抽提试剂用量也可以解决该问题的。
3. 抽提的可溶性蛋白溶液呈粘稠状。
 - a. 加入的蛋白抽提试剂的量不足。适当增加抽提试剂的用量。
 - b. 加入超级核酸酶或 DNase I 可降低样品的粘稠度。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com