

UltraBio™细菌活性蛋白抽提试剂

B751647

储存温度 2-8°C 储存。

产品介绍

阿拉丁生产的 UltraBio™细菌活性蛋白抽提试剂 (UltraBio™ Bacterial Active Protein Extraction Reagent) 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，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 DH5α、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。

产品应用

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。

产品优势

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。

操作步骤

1. 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。

a. 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。

b. 取 1.5ml OD₆₀₀ 为 0.5-2.0 的菌液，12,000-16,000g 4°C 或室温离心 2min，弃上清。

c. 用 0.2-0.4ml UltraBio™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。

d. 12,000-16,000g (16,000g 更佳) 4°C 离心 5min。

e. 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。

f. 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 5-15 μ l。

2. 大量可溶性蛋白抽提。

a. 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。

b. 收集 250ml OD₆₀₀ 约为 2.0 的菌液，5,000g 4°C 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。

c. 按照每 1g 湿菌加入 20-50ml UltraBio™ 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混合物 (P776695)) 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 的全能核酸酶以降低粘稠度。

d. 室温孵育 15min，充分抽提蛋白。

e. 12,000-16,000g (16,000g 更佳) 4°C 或室温离心 10min。

f. 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。

g. 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 5-15 μ l。

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。加入全能核酸酶或 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。

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. 加入全能核酸酶或 DNase I 可降低样品的粘稠度。

注意事项

1. 可以考虑选购蛋白酶抑制剂混合物 (P776695)、蛋白酶抑制剂混合物(His-Tag 蛋白纯化用, 100X) 或 PMSF (100mM)，并添加到本产品中以抑制蛋白降解。
2. 可以考虑选购重组全能核酸酶(O775185)，并添加到本产品中以降低抽提产物的粘稠度。
3. 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。
4. 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。
5. 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。但阿拉丁生产的 His-tag Purification Resin(耐还原螯合型) 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。
6. 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。为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。