



铁锤超级裂菌液

目录

1. 产品介绍	1
2. 使用方法	2
3. 注意事项	2
4. 订购信息	3

1. 产品介绍

1.1 细胞壁

大肠杆菌是实验室最常用的革兰氏阴性菌原核表达体系。革兰氏阴性菌的细胞壁由内外两层脂双层细胞膜夹杂一层肽聚糖组成。肽聚糖的糖链部分由高度重复二糖单元构成（N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸以 beta-1, 4 糖苷键连接），肽聚糖的肽段部分通常是通过丙氨酸的氨基和胞壁酸的羧基形成酰胺键，不同肽段的侧链之间再形成交联。

1.2 裂菌方法

常见的大肠杆菌裂解方法有两大类：1) 物理方法，例如超声法、均质法、研磨法、冻融法等。物理方法的优势在于不引入杂质成份、成本低、效率高。超声破碎法是实验室裂菌（0.5-5 L 培养物）的首选；工业级别的大体积高密度发酵菌体通常使用均质破碎方法，均质破碎法可以 1 小时内处理 10 L 以上菌体。研磨法和冻融法由于处理通量和效率的限制，往往只在特定的实验中使用。2) 化学方法，例如有机溶剂法、酸碱裂菌法、溶菌酶消化法。化学方法的优势在于不受体积的限制，可以处理微升级别样品。其中，酸碱裂菌法速度快、效率高，但条件剧烈不利于维持蛋白质的天然构象，此方法在质粒抽提中运用最为广泛。有机溶剂法也易造成蛋白的失活，仅适合特定应用方向。

1.3 裂菌液

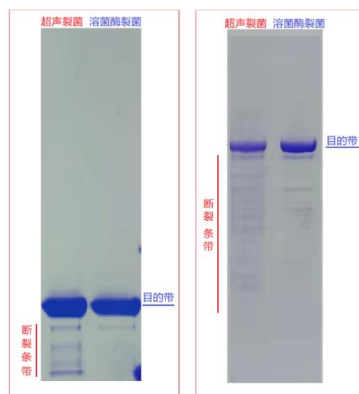
铁锤超级裂菌液（TieChui E.coli Lysis Buffer），适用于大肠杆菌菌体的快速、温和、低成本裂解，释放菌体内蛋白。本产品为单组份，操作简单、重复性好。含有的溶菌酶可以在 1 分钟内破开细菌细胞壁，将其降解为胞壁二糖；含有的核酸酶可在 1 分钟内消化细菌的 DNA 和 RNA，将其降解为寡聚核苷酸片段。使用本产品可以有效降低细菌裂解后上清粘度，抑制目的蛋白的降解，提高后续样品澄清效果，提升样品上柱纯化的效率，减少内毒素污染。

1.4 溶菌酶

裂菌液组份中含有溶菌酶，是一类水解细菌细胞壁的酶类总称，可以水解细菌肽聚糖的不同部位，例如 T7 噬菌体溶菌酶是一种酰胺酶（Amidase），可以打开肽聚糖的糖链和肽链之间的酰胺键；鸡蛋清溶菌酶可以打开肽聚糖的糖链部分（N-acetyl glucosaminidase）；内肽酶可以切开肽聚糖肽链（Endopeptidase）。铁锤超级裂菌液含有复合溶菌酶，可以在细菌细胞壁的不同位置高效切开裂口，实现胞内蛋白质的完美释放。

1.5 核酸酶

菌体破裂以后，胞内的蛋白质、小分子、DNA、RNA 都会释放到胞外，此时需要将核酸充分打断，否则带有强负电性的核酸将和目的蛋白以及杂质相互作用，导致纯化的产物纯度降低，并堵塞纯化填料、降低柱效以及影响填料的使用寿命。在超声和均质破菌方法中，物理的剪切力无差别的打断肽聚糖、核酸以及蛋白质，为降低样品粘度，通常要多次超声或者均质。过度的物理作用不仅会造成特定的目的蛋白断裂，纯化产物出现降解条带，也会因为热量的作用造成蛋白质的活力丧失。而铁锤超级裂菌液含有重组超级核酸酶，它可以快速切断 DNA、RNA，不会影响目的蛋白的一级序列以及高级结构的完整。因此使用本裂菌液提取蛋白，不会造成目的蛋白的“额外”破坏，是一种温和、快速、高效的破菌方案。超声裂菌和溶菌酶裂菌的纯化结果示例见下图。



超声与酶法裂菌纯化结果对比



1.6 保存条件

- 1.6.1 本产品为单组分，短期内（60 天）可放置于 2-8 °C 保存，长期保存可冻存于 -20 °C 或 -80 °C，避免反复冻融。
1.6.2 产品运输温度为 2-8 °C；可以在收到产品后，分装冻存，复溶后需要混合均匀再使用。

1.7 主要用途

- 1.7.1 小量细菌的快速裂解，后续可接小量诱导蛋白的可溶性鉴定。
1.7.2 中量细菌的快速裂解，后续可接蛋白纯化、性质表征。
1.7.3 大量细菌的快速裂解，降低样品粘度，有利于提高规模制备的效率以及蛋白纯度。

2. 使用方法

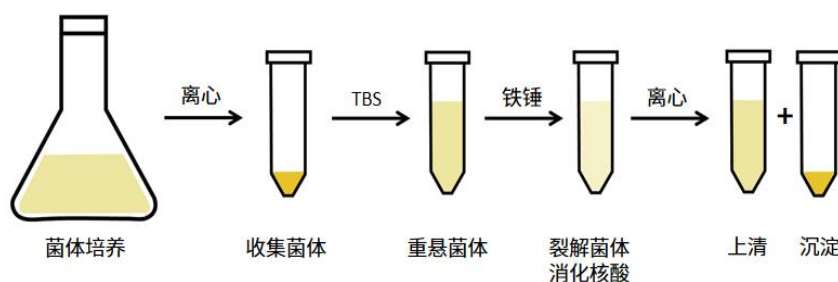


图 1. 裂解操作流程

2.1 菌体收集

- 2.1.1 对细菌进行培养，诱导表达目的蛋白。
2.1.2 通过离心、超滤等适当方法，去除发酵液上清，收集菌体，对菌体进行称重，记录重量。

2.2 菌体裂解

- 2.2.1 按照 1 g 湿菌体加入 9 ml Tris-HCl 缓冲液（如 TBS 缓冲液：20 mM Tris，150 mM NaCl，pH 7.6）的比例，对菌体进行重悬，确保分散充分，可采用旋涡震荡、磁力搅拌等手段。缓冲液不推荐磷酸盐（PBS），因其会抑制核酸酶活性，但抑制作用并不明显，如果使用 PBS 缓冲液，请适当延长裂菌时间。
2.2.2 按照菌体重悬液（步骤 2.2.1）体积的 1/9（V/V，例如：使用了 9 ml TBS 缓冲液重悬，就加 1 ml 裂菌液）加入铁锤超级裂菌液，颠倒混合均匀。
2.2.3 将步骤 2.2.2 样品置于 4-25 °C 条件下（温度根据蛋白稳定性进行合理选择），裂解 1-10 分钟，会看到菌体悬液从粘稠拉丝变成稀水状。如果目的蛋白可溶，可以选择快速裂解，约 1 分钟即可释放 80% 以上的目的蛋白至上清中；如果目的蛋白是包涵体，可以选择更长裂菌时间，尽量充分消化细胞壁，以便获得纯度更高的包涵体。
2.2.4 使用离心（离心力 > 8000 g）的方法，分离上清与沉淀。如果目的蛋白为可溶蛋白，取上清进行后续纯化；如果目的蛋白是包涵体，收集沉淀样品，对沉淀中的包涵体进行洗涤、变性溶解，再使用适当方法进行纯化。

3. 注意事项

- 3.1 因裂菌液采用了溶菌酶消化细胞壁的策略进行破壁，会释放胞壁二糖成份，竞争结合麦芽糖结合蛋白的底物结合位点，因此本产品与 MBP-tag 纯化体系不兼容。其它常见的 His-tag、GST-tag、Tactin II-tag、FC-tag、S-tag、protein A-tag、CBD-tag 等技术体系不受影响。
3.2 本产品使用了温和的非离子型去垢剂，不会造成蛋白失活，使用的复合溶菌酶以及超级核酸酶均不带纯化标签，不会干扰下游纯化。
3.3 实验室最常用的诱导剂为 IPTG，通常使用终浓度为 10 μM-1 mM，诱导剂浓度对于目的蛋白的溶解性影响并不大，不用在摸索诱导剂浓度上浪费时间，我们推荐使用 0.1 mM IPTG 的诱导浓度。若希望改善可溶比例，优先考虑低温以及增加促溶标签。乳糖也可以很好的诱导特定启动子的表达，最终收获的菌量会比 IPTG 更高。在 LB 培养基中，37 °C 诱导，通常 4 小时目的蛋白表达量即达到高峰，可以收集菌体。如果使用低温诱导，诱导时间可适当延长至 6-8 小时。过夜诱导对于大部分蛋白的表达并没有明显的收益，菌量增加很少但降解条带增多。
3.4 实验室的 LB 培养基表达，每升可以收获菌体约为 3 g，如果是发酵罐高密度发酵，每升培养基可以收获菌体 100 g。收获的菌体暂时不用，需要保存在 -20 °C 或 -80 °C 条件，防止降解。
3.5 对于使用 LB 培养基进行摇瓶培养，可以按照每升收获的菌体加入 27 ml TBS 缓冲液，低温震荡或者超声清洗槽内超声分散完全后加入 3 ml 铁锤超级裂菌液，震荡混匀即可看到菌体悬浊液逐渐消化呈稀水状。



3.6 菌体裂解在最优条件下 1 分钟即可以完成, 如果缓冲液不合适, 比如含有磷酸盐、含有高盐、pH 偏离中性等, 裂解速度会变慢。如果赶进度, 可以去离心, 对可溶目的蛋白的释放影响不大, 离心之后, 核酸酶与溶菌酶留在上清中, 可以继续消化。如果不赶进度, 可以适当延长裂菌时间。

3.7 室温 20-25 °C 条件下, 裂菌液含有的酶活力较高, 但通常推荐 4 °C 低温裂菌, 以控制目的蛋白的降解。

3.8 离心之后, 通常样品已经得到充分澄清, 并不需要再做深层过滤或者膜包过滤; 如果样品不够澄清, 可以考虑增加其它澄清步骤。

3.9 与上一代飞刀 TM 裂菌试剂盒相比, 铁锤超级裂菌液把核酸酶与溶菌酶整合到了一个溶液中, 属于 All in one 的形态, 使用更加简洁, 无需再添加额外的超级核酸酶。但加入裂菌液之前, 菌体要分散充分, 这样更有利于裂菌。

3.10 铁锤超级裂菌液不含有螯合剂 EDTA, 所以在使用镍亲和填料体系的时候不会造成镍离子的脱落。

3.11 铁锤超级裂菌液因其为 10×母液, 组分浓度较高, 在冻融过程中会因局部浓度过高而导致析出沉淀, 37 °C 水浴后即可溶解, 不影响使用。

4. 订购信息

名称	货号	规格
铁锤超级裂菌液	BR0005-02	100 ml
	BR0005-03	1 L