

## ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

### Набор для экстракции бактериального белка (НЭББ)

Артикул	Состав
123456.0010	<b>НЭББ-10</b> (на 10 г биомассы бактерий) <ul style="list-style-type: none"><li>• 10xНЭББ-буфер 50 мл</li><li>• лизоцим, 0,2 мл, 50 мг/мл</li><li>• бензонуклеаза, 0,2 мл в дозе 10000 ед/мл</li></ul>
123456.0025	<b>НЭББ-25</b> (на 25 г биомассы бактерий) <ul style="list-style-type: none"><li>• 10xНЭББ-буфер 100мл</li><li>• лизоцим, 0,5 мл, 50 мг/мл</li><li>• бензонуклеаза, 0,5 мл, 10000 ед/мл</li></ul>
123456.0100	<b>НЭББ-100</b> (на 100 г биомассы бактерий) <ul style="list-style-type: none"><li>• 10xНЭББ-буфер 500 мл</li><li>• лизоцим, 4×0,5 мл, 50 мг/мл</li><li>• бензонуклеаза, 4×0,5 мл, 10000 ед/мл</li></ul>
	<b>Условия хранения:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• 10x буфер - при комнатной температуре или при +4 °С.</li><li>• Лизоцим и бензонуклеаза при -20 °С.</li></ul>
	<b>Отдельные компоненты НЭББ:</b>
	<ul style="list-style-type: none"><li>• Лизоцим - 0,5 мл, 50 мг/мл в буфере (50 % глицерин; 20 мМ NaOAc, pH 4,7).</li></ul>
	<ul style="list-style-type: none"><li>• Бензонуклеаза - 0,5 мл, 10000 ед/мл, в буфере (50% глицерин, 50 мМ NaCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 20 мМ Tris-HCl, pH 8,0).</li></ul>
	<ul style="list-style-type: none"><li>• 10xНЭББ-буфер 100 мл. Состав: буфер содержит неионогенный детергент, 500 мМ NaCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub> в 100 мМ Tris-HCl, pH 8,0.</li></ul>
	<ul style="list-style-type: none"><li>• 10xНЭББ-буфер 500 мл. Состав: буфер содержит неионогенный детергент, 500 мМ NaCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub> в 100 мМ Tris-HCl, pH 8,0.</li></ul>

### Введение

**Набор для экстракции бактериального белка (НЭББ)** обеспечивает выделение белков из бактерий (*E.coli*) без использования механического разрушения клеток, таких как ультразвук или френч-пресс. **НЭББ** можно использовать для экстракции растворимого белка и телец включения из лизатов бактериальных клеток. В состав **НЭББ** входит яичный лизоцим и бензонуклеаза, повышающие эффективность экстракции белков с большой (> 70 кДа) молекулярной массой, и белков, экспрессируемых в тельцах включения. В зависимости от применения, дополнительные компоненты, такие как ингибиторы протеаз, соли, восстанавливающие и хелатирующие агенты могут быть добавлены к буферу (исключение составляет ЭДТА).

### Важная информация о продукте

- **НЭББ** экстрагирует белки из свежеприготовленных и замороженных клеток *E.coli*. Экстракция происходит более эффективно, когда клетки были предварительно заморожены. Количество необходимого реагента зависит от количества клеточной пасты.
- При необходимости, к буферу можно добавить ингибиторы протеаз не содержащие ЭДТА, соли и восстанавливающие агенты.
- **НЭББ** эффективно извлекает растворимые белки из распространенных в генноинженерной практике штаммов *E.coli* и особенно подходит для штамма BL21 и его производных. Если лизис неэффективен для определенного бактериального штамма, следует заморозить клетки перед процедурой экстракции.
- Экстракты, выделенные из клеток, совместимы с методами определения концентрации белка методом ВСА и методом Брэдфорда.
- Экстрагированные белки и тельца включения, пригодны для последующей очистки всеми существующими методами осаждения и колоночной хроматографии.

### Процедура экстракции белка из бактерий

1. Бактериальные клетки осадите центрифугированием при 5000×g в течение 10 минут.
2. Осадок (лучше после заморозки) суспендируйте в 1хНЭББ-буфере из расчёта 5 - 9 мл на 1 грамм клеточной пасты. Гомогенизируйте осадок до однородной суспензии.
3. Добавьте 2 мкл бензонуклеазы и 2 мкл лизоцима на 1 мл НЭББ-буфера. Если необходимо добавьте ингибиторы протеаз, не содержащие ЭДТА.
5. Инкубируйте 10-15 минут при комнатной температуре или большее время до полного исчезновения вязкости раствора.
6. Центрифугируйте лизат при 15000×g в течение 10 минут, чтобы отделить растворимые белки от нерастворимых белков или телец включения.
7. Супернатант используйте для последующих процедур очистки белка.
8. Тельца включения отмойте с помощью процедуры суспендирования в пяти объёмах 5хНЭББ-буфера и последующего центрифугирования при 10000×g в течение 5 минут. Процедуру повторите два-три раза.

Проблема при экстракции	Возможная причина	Решение
Бактерии не лизируются	Лизоцим имеет низкую активность или неактивен	Добавьте больше лизоцима в суспензию клеток или купите новый фермент
	Температура слишком низкая	Подогрейте культуру и другие реагенты до комнатной температуры
Вязкость экстракта высокая	Бензонуклеаза имеет низкую активность или неактивна	Добавьте больше бензонуклеазы в суспензию клеток или купите новый фермент
		Добавить Mg <sup>2+</sup> до конечной концентрации 2 мМ