

组织细胞总蛋白抽提试剂盒

产品货号：26406

产品规格：50次/100次

产品简介：

从组织细胞中提取总蛋白是Western Blot的关键步骤。实体软组织如脑脊髓富含磷脂，神经血管含大量结缔组织，而脂肪则含有大量油脂，常规的方法难以有效从这些组织中提取蛋白。本试剂盒为组织或培养细胞总蛋白提取提供完整的解决方案。用裂解-结合缓冲液匀浆裂解实体组织，或直接用裂解-结合缓冲液重悬培养细胞，然后加入抽提试剂去除非蛋白成分，离心、干燥后即可得到总蛋白。蛋白沉淀溶解后用常规方法进行蛋白定量。提取过程可在30-60分钟内完成，可在1.5ml离心管微量提取也可大规模制备，极为简便高效。通常一次提取10-100mg组织或 1×10^7 细胞所获得的总蛋白可进行几十到上百次分析，如蛋白质电泳、Western Blot、免疫共沉淀、制备2-D胶样品。

产品组成：

产品名称	50次	100次	保存条件
裂解-结合缓冲液	100ml	200ml	2-8℃
抽提试剂	100ml	200ml	2-8℃，避光

每毫升裂解缓冲液和抽提试剂可提取10-100mg组织或 1×10^7 细胞。试剂盒的裂解缓冲液是过量的。

适用：

各种实体软组织(> 1mg)，如脑、脊髓、神经结或纤维、脂肪、肝脏、消化道组织、肾脏、心脏、肌肉、血管、结缔组织等，各种原代细胞和永生化细胞系。

固体组织蛋白提取：

- 每10-100mg固体组织剪碎后加入0.5-1ml裂解液，放入玻璃匀浆器内上下手动匀浆15次；或用高速机械匀浆器 12,000rpm破碎组织。少量小的未破碎组织不影响后续抽提。注意：肝肾脾组织蛋白含量高，提取时应加较少量的组织，一般不超过50mg，否则形成的蛋白膜厚、致密且难溶。
- 仅取0.5ml组织匀浆液转移到1.5ml离心管，弃去剩余的组织匀浆液。每0.5ml组织匀浆液加入2倍体积的(1ml)抽提试剂充分混匀。室温或4℃静置10分钟，偶尔晃动。注意：(1)如组织量<10mg，在下一步离心时形成的蛋白膜易碎，静置30min有助蛋白膜形成。(2)提取脂肪组织时应4℃静置40min以上以充分去除油脂。(3)0.5ml组织匀浆液获得的蛋白足以进行几十次Western Blot。保证每0.5ml组织匀浆液加入2倍体积的(1ml)抽提试剂是成功的关键。
- 10,000 × g 4℃离心10分钟，溶液分为上下两相，两相中间为蛋白膜。吸除上层液体；随后用吸头或针头轻轻拨开蛋白膜，吸除下层液体。蛋白膜将附着于离心管壁。注意：(1)离心速度过高将使蛋白膜过于坚固，难以溶解。(2)如果不能分相，可再加入50μl蒸馏水混匀离心。(3)如果初始组织量较少(<10mg)，离心后难以得到完整的蛋白膜，此时可吸去上下层液体，加入1ml纯乙醇混匀，10,000 × g 4℃离心3分钟。弃所有液体，蛋白沉淀在管底。
- 敞开管口，室温空气干燥沉淀。未溶解的蛋白沉淀不含盐、去垢剂、和还原剂成分，可4℃或-20℃一年以上。



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

培养细胞蛋白提取 (参见固体组织蛋白提取程序中的斜体字注解):

1. 消化洗涤并800g离心收集细胞。每 $5-10 \times 10^6$ 细胞加入0.5ml裂解液, 振荡重悬, 4°C静置2分钟。
2. 按比例每0.5ml裂解液加入1ml抽提试剂, 振荡混匀。4°C 静置10min。
3. $10,000g$ 4°C离心10分钟, 溶液分为两相, 两相中间为蛋白膜。小心吸除上层相和大部分下层相, 保留两相中间的蛋白絮状物。如果不能分相, 可再加入50 μ l蒸馏水混匀离心。
4. 加入1ml纯乙醇洗涤沉淀。 $10,000g$ 4°C离心3分钟, 蛋白沉淀在管底。
5. 去除管中所有液体, 敞开口, 室温空气干燥蛋白沉淀。未溶解的蛋白沉淀不含盐、去垢剂、和还原剂成分, 可4°C或-20°C一年以上。

蛋白沉淀溶解与SDS-PAGE上样:

1. 沉淀溶解体积: 每1mg起始组织溶于2~5 μ l的终体积; 每 1×10^6 细胞获得的沉淀溶于50-200 μ l, 可获得很高的蛋白浓度。最后样品中的蛋白浓度可用每单位体积(ml)内的组织初始重量(mg)或细胞数量来校正和表示, 这种校正方法与实际的蛋白定量结果相比有很好的平行性, 也符合科学论文中表示惯例, 可免去后续的蛋白定量之烦扰。
2. 溶解: 采用以下方法之一溶解蛋白沉淀:
 - (1) 对于Western Blot检测目的, 加入适量体积的2% SDS水溶液、或直接加入标准的1 \times SDS-PAGE样品缓冲液 (62mM Tris-Cl pH6.8, 2%SDS, 2% Beta-巯基乙醇, 10%甘油, 0.04%溴酚兰)。这是最有效的溶解方法, 但如需进行蛋白定量, 只能用2% SDS溶液溶解沉淀并采用BCA方法进行蛋白定量。如果是疏水蛋白丰富的植物和细菌组织提取物, 可用4% SDS水溶液溶解。
 - (2) 如果确知欲检测的目的蛋白是可溶性蛋白, 可用蒸馏水或自备的其它缓冲液溶解沉淀。其优点是不干扰后续的蛋白定量, 缺点是在没有去垢剂存在的情况下沉淀溶解缓慢且某些膜/疏水蛋白不能完全溶解。
 - (3) 制备2-D胶样品时, 使用2-D胶样品缓冲液溶解, 直接进行下面的步骤4, 无需加热变性。
3. 95°C煮10分钟。在SDS存在的情况下, 加热将使染色体DNA变性形成高度粘稠物。加热—剧烈振荡—室温冷却, 再加热—振荡—室温冷却, 或者用接1ml注射器的细针头反复抽吸, 有助于彻底打断DNA, 降低粘度。
4. 室温放置30分钟, 或者4°C放置2小时或过夜。沉淀量少时可完全溶解。特别提示: 大块的沉淀通常看似不能完全溶解, 但实际上绝大部分细胞结构蛋白已经溶解出来, 残留的只是“空壳”, 肝肾组织提取物尤为明显。过夜后的不溶物主要包含不溶性结缔组织、胶原蛋白、各种组织基质。此步骤的不溶物, 再次用10%SDS溶解检测, 基本不含实验有用的可检测蛋白, 提示用户无需为此担心。
5. 12000rpm离心5min。取蛋白上清, 放心地弃去任何不溶性沉淀。不溶性沉淀留置于管内并不影响实验。
6. 凝胶上样: 如果上述步骤2的沉淀是直接溶于SDS-PAGE样品缓冲液, 可直接凝胶上样。否则, 应取1份样品上清与1份1 \times SDS-PAGE样品缓冲液(5mM或62mM Tris-Cl pH6.8, 2%SDS, 2% Beta-巯基乙醇或100mM DTT, 10%甘油, 0.04%溴酚兰), 1:1混合后上样。

说明:

1. 按照上述提取和溶解过程, 不加蛋白酶抑制剂, 而蛋白不会有明显降解, 用户不必(但可以)加入蛋白酶抑制剂。
2. 蛋白定量。注意使SDS浓度稀释到不影响蛋白定量的水平, 或选择不受SDS影响的BCA定量方法。BCA法<5% SDS浓度, Bradford法<0.125% SDS浓度。
3. 按比例可进行大规模的(多至1g) 组织蛋白提取。
4. 提取试剂对眼睛和呼吸系统有一定刺激性, 皮肤不慎接触可用水清洗。

保存条件: 2-8°C 避光保存 2 年。



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