

## 内质网蛋白提取试剂盒

产品货号：26202

产品规格：50T/100T

### 产品简介：

内质网存在于除哺乳动物成熟的红细胞外的各种真核细胞中。内质网为由生物膜构成的互相通连的片层隙状或小管状系统，膜片间的隙状空间称为池，通常与细胞外隙和细胞浆基质之间不直接相通。这种细胞内的膜性管道系统一方面构成细胞内物质运输的通路，另一方面为细胞内各种各样的酶反应提供广阔的反应面积。内质网的功能与蛋白质的合成、糖类和脂类的合成、解毒、同化作用有关，并且还具有运输蛋白质的功能。

内质网蛋白提取试剂盒可用于各种动物细胞和实体软、硬组织样本的内质网蛋白的提取。

本试剂盒提取的蛋白可用于Western Blotting、蛋白质电泳、免疫沉淀、ELISA、转录活性分析、Gel shift凝胶阻滞实验、酶活性测定等下游蛋白研究实验。

本试剂盒提取的蛋白为具有天然蛋白构象的活性蛋白。

本试剂盒中不含有EDTA，与金属螯和层析等下游应用兼容。

本试剂盒提取的蛋白样本含有高浓度的盐成分，不可直接用于2D电泳，需要除盐后再用于2D电泳。如下游实验需要直接用于等电聚焦、双向电泳，请使用其他货号的蛋白提取试剂盒。也可以将最后样品除盐后再用于2D电泳，用脱盐柱脱盐处理。

本试剂盒需要使用高速离心，没有高速离心的条件时，可以选择低速离心法内质网蛋白提取试剂盒。

### 产品内容：

| 产品名称          | 50T   | 100T  | 保存条件 |
|---------------|-------|-------|------|
| 试剂A：内质网蛋白提取液A | 25ml  | 50ml  | 2-8℃ |
| 试剂B：内质网蛋白提取液B | 25ml  | 50ml  | 2-8℃ |
| 试剂C：内质网蛋白提取液C | 10ml  | 20ml  | 2-8℃ |
| 试剂D：蛋白酶抑制剂混合物 | 100ul | 200ul | -20℃ |

注：

1. 蛋白酶抑制剂未开盖使用前也可以2-8℃储存。开盖使用后-20℃储存。
2. 蛋白酶抑制剂在2-8℃低温时是固体状态，从冰箱取出后恢复至室温或37℃短时间水浴，变成液体状态后离心至管底部再开盖。
3. 试剂拆封后请尽快使用完！

### 产品特点：

1. 使用方便，从细胞，组织中提取蛋白不需经过研磨、反复冻融、超声破碎等前处理。
2. 提取过程简单方便，将蛋白提取的时间缩短至30分钟-1小时。
3. 含蛋白稳定剂，提取的蛋白稳定。
4. 紫外检测蛋白浓度时，背景干扰低。
5. 总蛋白提取液含多种有效成分，可以充分释放胞浆蛋白、核蛋白和膜蛋白，又可结合释出的蛋白防止沉淀。
6. 蛋白酶抑制剂抑制了蛋白的降解，蛋白酶抑制剂配方优化。蛋白酶抑制剂混合物包含6种独立的蛋白酶抑制剂AEBSF、Aprotinin、Leupeptin、Pepstatin A、Bestatin、E-64，每一种抑制剂可特异性抑制某一种或几种蛋白酶活性。该混合物优化的组成使其可以抑制几乎所有重要的蛋白酶活性，包括丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、丙氨酰-氨基肽酶等。



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

#### 自备试剂和仪器：

离心机、振荡器、匀浆机/匀浆器、涡旋混匀器、移液器、冰箱、冰盒，PBS缓冲液、蛋白定量试剂盒，离心管、吸头、一次性手套

#### 使用方法：

##### 一、使用注意事项：

1. 旋帽离心管装的试剂在开盖前请短暂离心，将盖内壁上的液体甩至管底，避免开盖时液体洒落。
2. 实验过程中的所有试剂须预冷；所有器具须放-20℃冰箱预冷。整个过程须保持样品处于低温。
3. 最好使用标准Dounce匀浆器匀浆，如果没有Dounce匀浆器，也可用普通玻璃匀浆器匀浆，但是内质网蛋白回收率会下降。要求离心力50000×g的离心，没有条件的话可以采用30000×g-50000×g离心力，最好能达到45000×g左右。最小离心力需要保证30000×g。
4. 如果需要回收所有光面内质网小泡，最后一个离心步骤的离心力需要提高到100000×g力。
5. 离心机转速有相对离心力（RCF，×g）和每分钟转速（RPM）两种表示方式，有些离心机设置有RPM和×g显示切换，但部分离心机没有自动切换功能。需要用下面的公式进行换算： $g=r \times 1.118 \times 10^{-5} \times rpm^2$ （r为有效离心半径，即从离心机轴心到离心收集管底部中心位置的长度，单位为厘米）  
例如：转速为3000rpm，有效离心半径为10cm，则相对离心力（RCF，×g）为 $=10 \times 1.118 \times 10^{-5} \times 3000^2 = 1006.2$ （×g）。

##### 二、操作步骤

##### 细胞内质网蛋白提取：

##### 1. 提取液制备：

每200μl冷的蛋白提取液C中加入2μl蛋白酶抑制剂混合物，混匀后置冰上备用。

##### 【注】：

- 1) 根据需处理的样品数量准备蛋白提取液，蛋白酶抑制剂混合物不可以一次全部加入提取液。
- 2) 加过蛋白酶抑制剂的提取液一周内未使用完，再次使用前需要再次加入蛋白酶抑制剂。
- 3) 以下步骤中使用的蛋白提取液为此步配制好的含蛋白酶抑制剂的提取液。
2. 取 $1-2 \times 10^7$ 个细胞，在4℃，500×g条件下离心2-3分钟，小心吸取培养基，尽可能吸干，收集细胞；
3. 用冷PBS洗涤两次，每次洗涤后尽可能吸干上清。
4. 加入500μl冷的试剂A，置冰上10分钟。
5. 用Dounce匀浆器匀浆充分匀浆。

##### 【注】：

- 1) 先用Dounce匀浆器的松型槌初步匀浆10-20次，再用紧型槌匀浆20-30次。
- 2) 每上下一个来回为一次。
6. 匀浆液在4℃，1000×g力条件下离心5分钟。弃沉淀，取上清。
7. 将上清在4℃，11000×g力条件下离心10分钟。弃沉淀，取上清。
8. 将上清在4℃，50000×g力条件下离心45分钟。弃上清，留沉淀。

##### 【注】：

- 1) 离心时液体量少可以添加PBS。
- 2) 没有高速离心的条件时，可以选择低速离心法内质网蛋白提取试剂盒。
- 3) 如果期望回收所有光面内质网小泡，离心力需要提高到100000×g力。
9. 在沉淀中加入400μl冷的试剂B，混匀。
10. 在4℃，50000×g力条件下离心45分钟。弃上清，留沉淀。



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

**【注】：**

- 1) 离心时液体量少可以添加PBS。
- 2) 没有高速离心的条件时，可以选择低速离心法内质网蛋白提取试剂盒。
- 3) 如果期望回收所有光面内质网小泡，离心力需要提高到100000×g力。

11. 沉淀中加入100-200μl蛋白提取液C，充分混匀。

12. 在4℃条件下振荡20-30分钟。

**【注】：**

- 1) 用振荡器/摇床的较低转速，保持液体晃动即可。
- 2) 没有振荡器时，可以静置，中间每隔几分钟用移液器吹打混匀，稍微延长处理时间。

13. 即得到内质网蛋白样品，置冰箱备用或直接用于下游实验。

**【注】：**

- 1) 建议用BCA法进行蛋白定量。
- 2) 蛋白样品-80℃存放一年没有问题。注意不要被蛋白酶水解掉，不要被细菌污染。

**组织内质网蛋白提取：**

1. 提取液制备：

每200μl冷的蛋白提取液C中加入2μl蛋白酶抑制剂混合物，混匀后置冰上备用。

**【注】：**

- 1) 根据需要处理的样品数量准备蛋白提取液，蛋白酶抑制剂混合物不可以一次全部加入提取液。
- 2) 加过蛋白酶抑制剂的提取液一周内未使用完，再次使用前需要再次加入蛋白酶抑制剂。
- 3) 以下步骤中使用的蛋白提取液为此步配制好的含蛋白酶抑制剂的提取液。

2. 取50-100mg新鲜动物组织样本，用PBS洗涤干净。

3. 用剪刀尽可能剪碎，用冷PBS洗涤两次。

4. 加入500μl冷的试剂A，置冰上10分钟。

5. 用Dounce匀浆器充分匀浆30-40下，至无明显固体团块。

**【注】：**

- 1) 先用Dounce匀浆器的松型槌初步匀浆10-20次，再用紧型槌匀浆20-30次。
- 2) 每上下一个来回为一次。

6. 将匀浆液在4℃，1000×g力条件下离心5分钟。弃沉淀，取上清。

7. 将上清在4℃，11000×g力条件下离心10分钟。弃沉淀，取上清。

8. 将上清在4℃，50000×g力条件下离心45分钟。弃上清，留沉淀。

**【注】：**

- 1) 离心时液体量少可以添加PBS。
- 2) 没有高速离心的条件时，可以选择低速离心法内质网蛋白提取试剂盒。
- 3) 如果期望回收所有光面内质网小泡，离心力需要提高到100000×g力。

9. 在沉淀中加入400μl冷的试剂B，混匀。

10. 在4℃，50000×g力条件下离心45分钟。弃上清，留沉淀。

**【注】：**

- 1) 离心时液体量少可以添加PBS。
- 2) 没有高速离心的条件时，可以选择低速离心法内质网蛋白提取试剂盒。
- 3) 如果期望回收所有光面内质网小泡，离心力需要提高到100000×g力。

11. 沉淀中加入100-200μl蛋白提取液C，充分混匀。

12. 在4℃条件下振荡20-30分钟。



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

**【注】：**

- 1) 用振荡器/摇床的较低转速，保持液体晃动即可。
  - 2) 没有振荡器时，可以静置，中间每隔几分钟用移液器吹打混匀，稍微延长处理时间。
13. 即得到内质网蛋白样品，置冰箱备用或直接用于下游实验。

**【注】：**

- 1) 建议用BCA法进行蛋白定量。
- 2) 蛋白样品-80℃存放一年没有问题。注意不要被蛋白酶水解掉，不要被细菌污染。

**常见问题：**

1. 蛋白浓度低？  
处理部分样本时可能没有裂解完全，导致蛋白浓度低。只要适当延长试剂C的处理时间即可。最好在持续振荡的条件下处理，没有振荡器也可间隔几分钟用吸头吹打混匀。
2. 用什么方法定量蛋白？  
建议用BCA法。不适合用Bradford法，因为试剂A中含有干扰Bradford法的组份，导致定量不准。如果已经进行过透析处理或者用脱盐柱更换过缓冲体系，则可以用Bradford法定量。
3. 提取的蛋白具有活性吗？  
本试剂盒不含有离子型去垢剂组份，不破坏蛋白的结构，没有对蛋白质之间原有的相互作用的破坏，蛋白均保持其天然构象和活性。

**注意事项：**

1. 正式实验前请选取几个样本做预实验，以优化实验条件，取得最佳实验效果。
2. 螺旋盖微量试剂管装的试剂在开盖前请短暂离心，将盖和管内壁上的液体离心至管底，避免开盖时试剂损失。
3. 禁止与其他品牌的试剂混用，否则会影响使用效果。
4. 样品或试剂被细菌或真菌污染或试剂交叉污染可能会导致错误的结果。
5. 最好使用一次性吸头、管、瓶或玻璃器皿，可重复使用的玻璃器皿必须在使用前清洗并彻底清除残留清洁剂。
6. 实验后完成后所有样品及接触过的器皿应按照规定程序处理。

**保存：**2-8℃保存，有效期1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>