

组织细胞总蛋白抽提试剂盒

KP306 100毫升

试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	KP306
裂解-结合缓冲液	4°C	100 ml
抽提试剂	4°C	100 ml

本试剂盒在所需温度储存 24 个月不影响使用效果。

产品介绍:

组织细胞中提取总蛋白是 Western Blot 的关键步骤。试剂盒采用裂解-结合缓冲液匀浆裂解实体组织, 或者用裂解-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。

适用范围: 各种实体软组织(> 1 mg), 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。

操作步骤:

1. 固体组织蛋白提取

a. 每 10-100mg 固体组织剪碎后加入 0.5-1 ml 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。

b. 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°C 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°C 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(1 ml)抽提试剂是成功的关键。

- c. 10,000 × g 4°C 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°C 离心 3 分钟。弃所有液体, 蛋白沉淀在管底。
- d. 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°C 或 -20°C 一年以上。

2. 培养细胞蛋白提取

- a. 消化洗涤并 800g 离心收集细胞。每 5-10×10⁶ 细胞加入 0.5 ml 裂解液, 振荡重悬, 4°C 静置 2 分钟。
- b. 按比例每 0.5 ml 裂解液加入 1 ml 抽提试剂, 振荡混匀。4°C 静置 10min。
- c. 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 50μl 蒸馏水混匀离心。
- d. 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。
- e. 去除管中所有液体, 敞开管口, 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 μl 的终体积; 每 1 × 10⁶ 细胞获得的沉淀溶于 50-200 μl, 可获得很高的蛋白浓度。
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 × SDS-PAGE 样品缓冲液 (62 mM 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, 但如果只是需进行蛋白定量, 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。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。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 1 ml 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, 残留下的只是“空壳”, 肝肾组织提取物尤为明显。过夜后的不溶物基本不含实验有用的可检测蛋白。

5. 12000 rpm 离心 5 min。取蛋白上清, 弃去任何不溶性沉淀。

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 × SDS-PAGE 样品缓冲液(50 mM 或 62 mM 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。

相关说明

1. 按照上述提取和溶解过程, 不加蛋白酶抑制剂, 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。