

## 总蛋白提取试剂盒（无去垢剂）

产品货号：26340

产品规格：50T/100T

### 产品简介：

总蛋白提取试剂盒提供全套试剂，适用于从各种原代或传代培养物细胞和各种动物实体组织，如脑、脊髓、神经结或纤维、脂肪、肝脏、消化道、肾脏、心脏、肌肉、血管、结缔组织等动物组织样品中提取总蛋白。配合其他试剂时，也可以用于植物、细菌、真菌、酵母等样品的总蛋白提取。

本试剂盒含有的独特配方能够有效溶解细胞膜组份，包括细胞质膜、核膜和各种细胞器膜。本试剂盒含有的蛋白酶抑制剂混合物，阻止了蛋白酶对蛋白的降解，为提取高纯度的蛋白提供了保证。

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

本试剂盒的所有组份均不含去垢剂成分，最后得到的蛋白样品的成分对NI柱纯化、分子筛、离子交换、亲和纯化等下游应用没有去垢剂影响。

本试剂盒的蛋白提取组份中不含有不可透析除去去垢剂组份，不含SDS、Triton X-100、chaps等可能影响质谱实验的组份，最后得到的蛋白质样品经过透析或者脱盐处理后将不含有去垢剂、高浓度盐等影响，基本可以满足下游任意的蛋白质组学相关实验研究。

本试剂盒提取的蛋白为具有天然蛋白构象的活性蛋白，下游应用范围广，提取液裂解细胞的能力较温和，需要根据实际样本情况优化裂解时间。

本试剂盒不含有EDTA，与金属螯合层析等下游应用兼容。

本试剂盒提取得蛋白样本含有高浓度得盐成分，不可直接用于2D电泳，将最后样品脱盐后用于2D电泳。

本试剂盒按每个处理样本50mg细胞/组织计（大约50 $\mu$ l细胞沉淀体积），如果需要处理大量的细胞/组织，将提取液按细胞体积的1: 10加入细胞沉淀即可。每个50T试剂盒大约可以提取2.5g细胞/组织样本的总蛋白。根据不同的细胞类型，100mg细胞沉淀物（10<sup>7</sup>个细胞）的总蛋白质产量大约为6mg左右。

### 试剂组成：

产品名称	50T	100T	保存条件
蛋白提取液A	25ml	5ml	2-8 $^{\circ}$ C
蛋白酶抑制剂混合物B	100 $\mu$ l	200 $\mu$ l	-20 $^{\circ}$ C

### 使用前请注意：

1. 蛋白酶抑制剂未开盖使用前也可以2-8 $^{\circ}$ C储存。开盖使用后-20 $^{\circ}$ C储存。
2. 蛋白酶抑制剂在2-8 $^{\circ}$ C低温时是固体状态，从冰箱取出后恢复至室温或37 $^{\circ}$ C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！

### 自备试剂和仪器：

离心机、振荡器、涡旋混匀器、匀浆机/匀浆器、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。

### 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. 将蛋白提取的时间缩短至30min-1h。
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. 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，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



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

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。

#### 操作步骤:

##### 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. 蛋白酶抑制剂储存期间溶液如果出现沉淀，不影响使用，溶解后正常使用。
4. 如果试剂盒不能短时间内用完，蛋白酶抑制剂混合物不可以一次全部加入提取液。
5. 可以根据自己实验需要加入其它蛋白酶抑制剂单品。
6. 下游实验如果是进行特定蛋白酶或磷酸酶的酶活性检测，提取液可以不加蛋白酶抑制剂或磷酸酶抑制剂，注意提取过程保持低温操作，缩短离心时间。
7. Western实验内参可以选用beta-actin、GAPDH、Tubulin。
8. 蛋白酶抑制剂在2-8℃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。

##### 二、细胞样本总蛋白提取

###### 悬浮细胞蛋白提取

###### 1. 提取液准备:

每500μL冷的蛋白提取液中加入2μL蛋白酶抑制剂混合物，充分混匀后置冰上备用。

###### 【注】:

- (1) 根据需要处理样本数量准备蛋白提取液，蛋白酶抑制剂混合物不可以一次性全部加入提取液。磷酸酶抑制剂可以一次加入。
  - (2) 加入蛋白酶抑制剂的提取液一周内未使用完全，再次使用前需要再次加入蛋白酶抑制剂。
  - (3) 下游实验如果是进行特定蛋白酶或磷酸酶的酶活性检测，注意根据实际情况调整抑制剂混合物是否加入。
  - (4) 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 $5 \times 10^6$ 个细胞，在4℃，2500×g条件下离心5min，小心吸取培养基，尽可能吸干，收集细胞。

###### 【注】:

- (1) 细胞数量根据实验情况调整，每次的裂解液用量并不是一定的，请根据实际情况调整。
- (2) 一般按细胞压积的10倍左右加入裂解液即可。如果需要提高得到的蛋白样品浓度，可以
- (3) 将细胞：提取液用量比例调整为1：5。
3. 用冷PBS洗涤细胞两次，每次洗涤后尽可能吸干上清。（加入PBS混匀，2500×g离心5min）
4. 每 $5 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$ 个细胞（大约50mg细胞/50μL细胞沉淀体积）中加入500μL冷的总蛋白提取液，吹打混匀后，在4℃条件下振荡20-30min，至细胞充分裂解，无明显细胞沉淀。

###### 【注】:

- (1) 使用振荡器/摇床的较低转速，提取液能轻微晃动即可。
- (2) 没有震荡条件也可以不振荡，稍微延长提取液处理的时间，中间每隔几分钟用移液器吹打均匀即可。
5. 在4℃，12000×g条件下离心15min。
6. 将上清吸入另一预冷的干净离心管，即可得到总蛋白。
7. 将上述蛋白提取物定量后分装于-80℃冰箱保存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) 蛋白样品在-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。
8. 将蛋白样品透析处理或者脱盐柱脱盐处理后用于下游实验。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址:郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

**【注】：**

- (1) 蛋白样品中含有盐，需要脱盐处理后用于双向电泳。
- (2) 经透析或脱盐离心柱处理的蛋白样品不含有去垢剂和高浓度盐。

**贴壁细胞蛋白提取**

1. 提取液准备：

每500 $\mu$ L冷的蛋白提取液中加入2 $\mu$ L蛋白酶抑制剂混合物，充分混匀后置冰上备用。

**【注】：**

- (1) 根据需要处理样本数量准备蛋白提取液，蛋白酶抑制剂混合物不可以一次性全部加入提取液。磷酸酶抑制剂可以一次加入。
- (2) 加入蛋白酶抑制剂的提取液一周内未使用完全，再次使用前需要再次加入蛋白酶抑制剂。
- (3) 下游实验如果是进行特定蛋白酶或磷酸酶的酶活性检测，注意根据实际情况调整抑制剂混合物是否加入。
- (4) 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. 小心吸取贴壁细胞的培养液。

3. 用冷PBS洗涤细胞两次，每次洗涤后尽可能吸干PBS。（加入PBS混匀，2500 $\times$ g离心5min）

4. 加入适量冷的总蛋白提取液，振荡15-30min，至细胞充分裂解，用细胞刮刀刮一遍，将裂解液吸入另一干净离心管。

**【注】：**

- (1) 推荐裂解液使用量：60mm培养皿250 $\mu$ L-500 $\mu$ L；100mm培养皿500 $\mu$ L-1mL；6孔板200 $\mu$ L -250 $\mu$ L/孔；24孔板100 $\mu$ L/孔；96孔板50 $\mu$ L/孔；75cm<sup>2</sup>培养瓶500 $\mu$ L-1mL。
- (2) 也可用细胞刮刀刮下细胞或者用胰酶将细胞消化下来后按悬浮细胞操作步骤进行。
5. 在4 $^{\circ}$ C，12000 $\times$ g条件下离心15min。
6. 将上清吸入另一个预冷的干净离心管，即可得到总蛋白。
7. 将上述蛋白提取物定量后分装于-80 $^{\circ}$ C冰箱保存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) 蛋白样品在-80 $^{\circ}$ C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。
8. 将蛋白样品透析处理或者脱盐柱脱盐处理后用于下游实验。

**【注】：**

- (1) 蛋白样品中含有盐，需要脱盐处理后用于双向电泳。
- (2) 经透析或脱盐离心柱处理的蛋白样品不含有去垢剂和高浓度盐。

**三、组织样本总蛋白提取**

1. 提取液准备：

每500 $\mu$ L冷的蛋白提取液中加入2 $\mu$ L蛋白酶抑制剂混合物，充分混匀后置冰上备用。

**【注】：**

- (1) 根据需要处理样本量准备蛋白提取液，蛋白酶抑制剂混合物不可以一次性全部加入提取液。磷酸酶抑制剂可以一次加入。
- (2) 加入蛋白酶抑制剂的提取液一周内未使用完全，再次使用前需要再次加入蛋白酶抑制剂。
- (3) 下游实验如果是进行特定蛋白酶或磷酸酶的酶活性检测，注意根据实际情况调整抑制剂混合物是否加入。
- (4) 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组织样本，用PBS洗干净，然后用手术剪刀尽可能剪碎，加入500 $\mu$ L总蛋白提取液，用组织匀浆器/匀浆机匀浆至无明显肉眼可见固体。

**【注】：**

- (1) 如果组织样品很细小，可以剪碎后直接加入提取液振荡15min，可以不用匀浆器。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

- (2) 一般按组织：提取液用量1：10 (w/v) 左右加入提取液即可。如果需要提高得到的蛋白样品浓度，可以将组织：提取液用量比例调整为1：5。
- (3) 也可用液氮研磨的方法，采用常规的液氮研磨方法即可。
3. 将组织匀浆吸入一预冷的干净离心管中，在4°C条件下振荡10-20min。

**【注】：**

- (1) 使用振荡器/摇床的较低转速，提取液能轻微晃动即可。
- (2) 没有振荡条件也可以不振荡，稍微延长提取液的处理时间，中间每隔几分钟用移液器吹打混匀即可。
4. 在4°C，10000-14000×g条件下离心15min。
5. 将上清吸入另一个预冷的干净离心管，即可得到总蛋白。
6. 将上述蛋白提取物定量后分装于-80°C冰箱保存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) 蛋白样品在-80°C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。
7. 将蛋白样品透析处理或者脱盐柱脱盐处理后用于下游实验。

**【注】：**

- (1) 蛋白样品中含有盐，需要脱盐处理后用于双向电泳。
- (2) 经透析或脱盐离心柱处理的蛋白样品不含有去垢剂和高浓度盐。

**常见问题分析：**

1. 蛋白浓度低？

处理部分组织样本时可能没有裂解完全，导致蛋白浓度低。只要适当增加试剂A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改换过缓冲体系，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。

4. 细胞裂解速度慢？

为了充分保证提取得到的蛋白的活性，提取液采用独特的保护蛋白的配方，裂解能力温和，下游应用范围广。适当延长裂解的时间即可。

5. 提取时出现胶状沉淀？

蛋白提取液处理产物中有时会出现少量透明胶状物，属正常现象。该透明胶状物为含有基因组DNA等的复合物。不检测和基因组DNA结合特别紧密的特定蛋白的情况下，可以直接离心取上清进行后续实验即可；如果需要检测和基因组结合特别紧密的蛋白，则可以通过超声处理，300w/10s间隔10s，超声3min，随后离心取上清用于后续实验。检测一些常见的转录因子，例如NF-kappaB、p53等时，不必进行超声处理。

**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. 实验完成后所有样品及接触过的器皿应按照规定程序处理。

**有效期：**12个月有效。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com