

植物高尔基体膜蛋白提取试剂盒

产品货号：26304

产品规格：50T/100T

产品简介：

植物高尔基体膜蛋白提取试剂盒提供全套试剂，适用于从各种植物组织样本的高尔基体膜蛋白提取。提取过程简单方便，可在1小时内完成。提取的膜蛋白不仅纯度高，保持天然活性，而且绝少交叉污染。

本试剂盒含有的独特配方能够有效溶解膜组份。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、免疫沉淀、ELISA、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，如下游实验需要直接用于等电聚焦、双向电泳，请使用其他试剂盒。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。

高尔基体(Golgi apparatus, Golgibodies)是由许多扁平的囊泡构成的以分泌为主要功能的细胞器。又称高尔基器或高尔基复合体；高尔基体是由数个扁平囊泡堆在一起形成的高度有极性的细胞器。常分布于内质网与细胞膜之间，呈弓形或半球形，凸出的一面对着内质网称为形成面(forming face)或顺面(cis face)。凹进的一面对着质膜称为成熟面(mature face)或反面(trans face)。顺面和反面都有一些或大或小的运输小泡，在具有极性的细胞中，高尔基体常大量分布于分泌端的细胞质中。因其看上极像滑面内质网，因此有科学家认为它是由滑面内质网进化而来的。

高尔基体中的酶主要有糖基转移酶、磺基-糖基转移酶、氧化还原酶、磷酸酶、蛋白激酶、甘露糖苷酶、转移酶和磷脂酶等不同的类型。高尔基体的主要功能将内质网合成的蛋白质进行加工、对比分类、与包装，然后分门别类地送到细胞特定的部位或分泌到细胞外。

产品组成：

产品组成	50T	100T	保存
组分A：高尔基体提取液A	50ml	100ml	2-8°C
组分B：高尔基体提取液B	25ml	50ml	2-8°C
组分C：高尔基体蛋白提取液C	20ml	40ml	2-8°C
组分D：膜蛋白溶解液D	10ml	20ml	2-8°C
组分E：蛋白酶抑制剂混合物	100μl	200μl	-20°C

注：

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



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

QQ：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

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Dounce匀浆器匀浆，如果没有Dounce匀浆器，用普通玻璃匀浆器匀浆也可，但是蛋白回收率会下降。
4. 提取液C在使用前须一直置于2-8℃条件，否则下游膜蛋白提取时会导致不容易分层。
5. 膜蛋白电泳时loading buffer应该避免煮沸。
6. 膜蛋白电泳时可以提高loading buffer的SDS含量。
7. 离心机转速有相对离心力（RCF，×g）和每分钟转速（RPM，r/min）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：
$$g=r \times 1.118 \times 10^{-5} \times \text{rpm}^2$$
（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

1. 提取液准备:

每500μl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)提取液C在使用前须一直置于2-8℃条件，否则下游膜蛋白提取时会导致不容易分层。
- 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100-200mg新鲜植物叶片组织样本，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1000μl冷的试剂A，置冰上10分钟。

5. 用匀浆机/匀浆器充分匀浆。

6. 匀浆液在4℃，1000×g力条件下离心5分钟。弃沉淀，收集上清。

【注】:

- 1)如果是黏液较多的样本，匀浆后成为粘稠的一团，可以在匀浆液中添加1-2ml PBS缓冲液，混匀后再离心。
7. 上清在4℃，3000×g力条件下离心10分钟。弃沉淀，将上清吸入另一预冷的干净离心管。
8. 将上清在4℃，6000×g力条件下离心10分钟。弃沉淀，收集上清。
9. 上清在4℃，50000×g力条件下离心20分钟。弃上清，留沉淀。

【注】:

- 1)没有50000×g离心条件，可以降低离心力。
- 2)如果用大的离心转头，液体量太少不方便离心的话，可以添加PBS增加液体量。
- 3)至少要保证20000×g以上离心力。
- 4)降低离心力后高尔基体蛋白回收率会下降。

10. 在沉淀中加入500μl冷的试剂B，混匀。

11. 在4℃，50000×g力条件下离心30分钟。弃上清，收集沉淀。

【注】:

- 1)没有50000×g离心条件，可以降低离心力。
- 2)如果用大的离心转头，液体量太少不方便离心的话，可以添加PBS增加液体量。



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

- 3)至少要保证20000×g以上离心力。
- 4)降低离心力后高尔基体蛋白回收率会下降。
12. 在沉淀中加入400μl蛋白提取液C,吹打混匀后,在4°C条件下振荡15-30分钟,至沉淀充分裂解,无明显沉淀。
【注】:
 - 1)此步骤必须在2-8°C条件振荡。
 - 2)使用振荡器/摇床的较低转速,提取液能轻微晃动即可。
 - 3)没有2-8°C振荡条件也可以不振荡,置2-8°C静置,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)此步如果沉淀裂解不充分,下步沉淀体积没有减少,请延长2-8°C振荡裂解时间至40分钟或更长,直至沉淀充分裂解。
13. 在4°C, 12000×g条件下离心5分钟。
14. 将上清吸入另一干净离心管,在37°C水浴(气浴)15分钟。
15. 在37°C, 1000×g离心5分钟。此时溶液分为2层,下层是膜蛋白约为30-50μl。
【注】:
 - 1)此步骤必须在37°C条件下离心。
 - 2)没有37°C离心条件也可以不离心,稍微延长37°C水浴时间,至液体澄清,分层清晰。
16. 小心移除上层,留下下层大约40μl液体。
17. 用50-100μl膜蛋白溶解液D溶解下层,即可得到高尔基体膜蛋白样品。
【注】:
 - 1)膜蛋白比较难溶解,不能很快溶解混匀,可以在加入溶解液后稍微吹打混匀,然后置于4°C冰箱静置至溶解。中途用移液器轻轻吹打混匀一次。静置后取出再次用移液器稍微吹打混匀即可。
 - 2)于4°C静置直至管底透明胶状物完全溶解。
18. 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-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。

常见问题分析:

1. 蛋白浓度低?
膜蛋白丰度比较低,在条件允许的情况下,需要尽可能加大组织样本上样量以提高膜蛋白浓度。
减少膜蛋白溶解液用量。
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。
4. 膜蛋白电泳没有条带?
 - 1)膜蛋白样品通常浓度较低,电泳前一定要进行蛋白定量,以保证电泳是蛋白上样量足够。
 - 2)膜蛋白提取好后,用溶解液充分溶解后,可以超声处理一下,再进行蛋白定量。
 - 3)蛋白加Loading buffer后可以不用煮沸,采用50°C保温30分钟。
 - 4)蛋白Loading buffer中SDS终浓度含量可以提高至3%-10%。
 - 5)有些样品的膜蛋白含量太低,可以使用丙酮沉淀膜蛋白,再使膜蛋白溶解于上样缓冲液中,一般可以跑



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

出清晰的蛋白条带。

- 6) 电泳时最好采用低电压低电流电泳。
- 7) 膜蛋白丰度通常较低，有条件可以尝试用银染染色。

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。

保存条件：

2-8°C，保存12个月。



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