

胞质和线粒体蛋白质提取试剂盒

产品货号: 26503

产品规格: 50 assays

产品介绍:

本试剂盒提供独特的组份可以提取动物细胞及组织中的胞质蛋白和线粒体蛋白, 该方法先将完整的有活性的线粒体和胞质蛋白分离, 经过再处理后获得高纯度的有活性胞质蛋白及变性的线粒体蛋白, 不需要超速度离心, 方法简单, 可靠, 快速。可用于1D, 2D电泳, Western Blot, Elisa等蛋白质实验。提取的完整线粒体也可以经过活性溶解液处理, 再用于免疫共沉淀, 凋亡, 细胞信号传导, 能量代谢等生理学研究或进行线粒体DNA提取, 用于基因组学后续研究。本试剂盒可以每次从 1×10^7 个培养细胞或200mg组织中提取所需要的蛋白质, 可以使用50次。

产品组成:

产品名称	规格	保存条件
试剂(A): 胞质提取Buffer	55ml	2-8°C
试剂(B): 线粒体溶解Buffer	5ml	-20°C
试剂(C): 蛋白酶抑制剂	60 μ l	-20°C
试剂(D): 磷酸酶抑制剂	300 μ l	-20°C
试剂(E): DTT	60 μ l	-20°C

产品特点:

1. 整个实验过程大约只需要 1 小时左右;
2. 可以从 50×10^7 个培养细胞或 50×200 mg 组织中提取所需要的蛋白质或活性线粒体;
3. 活性线粒体的提取量高, 高效线粒体溶解 Buffer 提取的蛋白质可用于线粒体蛋白质组学研究;
4. 不需要超速度离心, 可以同时处理多个样品。

操作步骤(仅供参考):

1. 收集不少于 1×10^7 细胞, 用预冷的 $1 \times$ PBS (pH7.4) 洗涤细胞两次, 每次 3000rpm (800g) 离心 5min; 组织样本 (200mg) 尽量去除脂肪组织和结缔组织等非目的组织, 置于冰上剪碎, 再用预冷的 $1 \times$ PBS (pH7.4) 洗涤三次。
2. 向上述细胞或组织样本中加入 1mL 胞质提取 Buffer (使用前向每 mL 胞质提取 Buffer 中加入 1 μ l 蛋白酶抑制剂, 5 μ l 磷酸酶抑制剂和 1 μ l DTT), 置玻璃匀浆器冰上均质 30~50 次, 置于冰上冷却。均质破碎细胞应镜检, 细胞破碎率不小于 90%。
 - 不要过度匀浆, 以免线粒体膜破裂, 线粒体基粒和基质外流, 使得胞质蛋白和线粒体蛋白的分离变得困难。
3. 将匀浆液转移至预冷的离心管中, 最大转速涡旋剧烈振荡 15sec, 放置冰上 10~15min, 于 4°C, 3000rpm 离心 10min, 弃沉淀。
 - 沉淀中为未破碎的细胞, 细胞核和一些细胞碎片。重复步骤 3 可以进一步去除上清中的残余的细胞核, 细胞碎片等杂质。
4. 取上清转移至新预冷离心管中, 于 4°C, 12000rpm (12830g) 离心 30min 以沉淀线粒体, 上清转至新管中, 为胞质蛋白, -80°C 冷冻保存。
 - 如果需要得到更为纯净的胞质蛋白, 可以将在步骤 4 中得到的胞质蛋白在 4°C, 15000rpm (20000g) 离心 30min, 弃沉淀 (可能含有溶酶体, 过氧化氢体的杂质和少量线粒体), 保留上清。
5. 取沉淀, 加入 0.1mL 胞质提取 Buffer (注: 使用前向每 mL 胞质提取 Buffer 中加入 1 μ l 蛋白酶抑制剂, 5 μ l 磷酸酶抑制剂和 1 μ l DTT), 涡悬振荡洗涤 30sec, 置于 4°C, 13000rpm (15000g) 离心 10min, 弃上清。
6. 在沉淀中加入 0.1mL 的线粒体溶解 Buffer (使用前向每 mL 线粒体溶解 Buffer 中加入 1 μ l 蛋白酶抑制剂, 5 μ l 磷酸酶抑制剂和 1 μ l DTT), 冰上静置 30min, 再涡悬振荡 30sec, 置于 4°C, 13000rpm (15000g) 离心 10min,



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

得到的上清即为线粒体蛋白(为变性蛋白), 可用于 SDS-PAGE 电泳。

- 如果需要完整的有活性的线粒体, 请将步骤 4 中得到的线粒体沉淀用冷的胞质提取 Buffer 悬浮后 2~8°C 保存。如果用于线粒体活性蛋白研究, 请将线粒体沉淀溶解于 0.1mL 预冷的活性溶解液 (20mmol/L Tris-HCl pH7.5、2mmol/L EGTA、2mmol/L EDTA、1% Triton X-100), 每 mL 线粒体活性溶解液中加入 1 μ l 蛋白酶抑制剂和 1 μ l DTT, 冰上静置 60min, 再涡悬振荡 30sec, 4°C, 13000rpm (15000g) 离心 10min, 取上清。

注意事项:

1. 所有的试剂及器具均需预冷后使用, 以保证蛋白质的完整性和活性。
2. 一般常规提取的蛋白样品, 进行后续试验不需要透析, 但如果需要较大量的提取蛋白或后续试验结果不理想, 需要将提取的蛋白样品进行透析脱盐。
3. 可以使用 Sephadex 重力型脱盐柱脱盐或将缓冲液替换为实验所需要的目的蛋白质的合适缓冲液。
4. 对于提取的蛋白质可以采用我公司生产的非干扰型蛋白质浓度定量试剂盒对提取样品中的蛋白质进行定量。
5. 如果用于蛋白质质谱研究, 请用请用我公司生产的铜染或锌染或质谱用快速银染试剂盒对胶上的蛋白质进行染色, 这些染色方法对蛋白质没有修饰作用, 所以对质谱图没有影响。对于一般的染色, 可以采用无毒型考马氏亮蓝染色液或高灵敏考马氏亮蓝染色液或通用型蛋白染色液进行染色。
6. 线粒体溶解 Buffer 在-20°C保存时, 若有沉淀析出, 可置于 30°C水浴中保温 10min, 并振荡混匀, 待沉淀完全溶解, 冷却至室温后即可使用。
7. 产品中的保存条件及有效期均以未开封情况下计算, 为了防止产品与空气接触发生化学反应影响产品性能, 将未使用完毕的组分按存储要求保存同时建议开封后的组分尽快使用完毕。
8. 使用后请旋紧瓶盖, 防止溶液挥发和与空气中的物质发生化学反应。
9. 本试剂盒只能够用于体外实验, 不能够用于临床、治疗和动物体内实验等, 由此产生的后果, 概不承担责任。

有效期: 24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