



大肠杆菌膜蛋白提取试剂盒

货号: EX2150

规格: 50T/100T

有效期: 2-8°C保存, 有效期一年。

产品内容:

名称	50T	100T	储存条件
大肠杆菌膜蛋白提取液 A	25ml	50ml	2-8°C保存
大肠杆菌膜蛋白提取液 B	250ul	500ul	2-8°C保存
膜蛋白溶解液 C	10ml	20ml	2-8°C保存
蛋白酶抑制剂混合物	100ul	200ul	-20°C保存

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!

产品简介:

大肠杆菌膜蛋白提取试剂盒是一种高效的高产膜蛋白提取试剂盒。大肠杆菌膜蛋白提取试剂盒可以从各种大肠杆菌菌体中提取膜蛋白, 可用于纯化蛋白的粗品制备及膜蛋白制备。提取过程简单方便。该试剂盒含有蛋白酶抑制剂混合物, 阻止了蛋白酶对蛋白的降解, 为提取高质量的蛋白提供了保证。

本试剂盒提取的蛋白可用于 WesternBlotting、蛋白质电泳、免疫沉淀、ELISA、转录活性分析、Gelshift 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, 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。

本试剂盒中不含有 EDTA, 与金属螯和层析等下游应用兼容。

产品特点:

- 1、使用方便, 从大肠杆菌中提取蛋白不需经过超声破碎等前处理。
- 2、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。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; 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、丙氨酸-氨基肽酶等。

5、本品不含 EDTA，可以用于金属螯合层析等下游应用。

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、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、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。
- 5、提取液A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。
- 6、可以根据自己实验需要加入其它蛋白酶抑制剂单品。

二、操作步骤：

1.提取液制备：

每 500ul 冷的提取液 A 中加入 5ul 提取液 B 和 2ul 蛋白酶抑制剂混合物，充分混匀后置冰上备用。

2.离心收集菌体，用 PBS 洗菌体 2 次。

3.按每 100-150mg 湿重菌体样本加入 500ul 冷的提取液 A(大约菌体和提取液体积比 1:3-1:5，完全淹没菌体即可)，吹打混匀，在 2-8℃振荡 1-2 小时，至菌体裂解完全，菌体沉淀减少。

4.将菌体提取液在 2-8℃低温下 12000×g 离心 5 分钟，弃沉淀，取上清。

5.将上清液在 37℃水浴 10 分钟。

6.在 37℃，1000×g 离心 3 分钟。

7.此时液体分为 2 层，小心移除上层溶液，留管底部下层，大约 50ul 液体。

8.用 50-200ul 冷的膜蛋白溶解液溶解该下层部分，即得大肠杆菌膜蛋白样品。

9.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。

常见问题分析：

1.蛋白浓度低？

膜蛋白丰度较低，需要尽可能加大细胞上样量。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.膜蛋白电泳没有条带？

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。蛋白样品中含有去垢剂，注意蛋白定量方法的选择，防止不合适的方法导致的蛋白浓度数据异常偏高，从而导致依据错误的蛋白浓度数据上样导致上样量不够。

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。蛋白加Loadingbuffer后可以不用煮沸，采用50℃保温30分钟。

蛋白Loadingbuffer中SDS终浓度含量可以提高至3%-10%。

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，一般可以跑出清晰的蛋白条带。

电泳时最后采用低电压低电流电泳。

注意事项：

1. 本试剂盒仅供科学研究使用，不可用于诊断或治疗。
2. 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。
3. 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。
4. 避免皮肤或粘膜与试剂接触。

如果试剂不小心接触皮肤或眼睛，应立即用水冲洗。