



核糖体蛋白提取试剂盒

货号: EX2980

规格: 50T/100T

有效期: 2-8℃保存, 有效期一年。

产品内容:

名称	50T	100T	储存条件
核糖体提取液 A	50ml	100ml	2-8℃保存
核糖体提取液 B	25ml	50ml	2-8℃保存
核糖体蛋白提取液 C	10ml	20ml	2-8℃保存
蛋白酶抑制剂混合物 D	100μl	200μl	-20℃保存

注:

1. 有效期为试剂盒未拆封前按要求条件保存的有效期。
2. 试剂拆封后请尽快使用完!

产品简介:

核糖体是细胞内一种核糖核蛋白颗粒(ribonucleoprotein particle),主要由 RNA 和蛋白质构成,其惟一功能是按照 mRNA 的指令将氨基酸合成蛋白质多肽链,所以核糖体是细胞内蛋白质合成的分子机器。核糖体无膜结构,主要由蛋白质(40%)和 RNA(60%)构成。核糖体按沉降系数分为两类,一类(70S)存在于细菌等原核生物中,另一类(80S)存在于真核细胞的细胞质中。他们有的漂浮在细胞内,有的结集在一起。

本试剂盒可用于各种动物细胞和实体软、硬组织样本的核糖体蛋白的提取。

本试剂盒提取的蛋白可用于Western Blotting、蛋白质电泳、免疫沉淀、ELISA、转录活性分析、Gel shift 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。

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,得到的蛋白样品需要用脱盐柱脱盐处理,再用于2D 电泳。

本试剂盒需要使用高速离心。

自备试剂和仪器:

离心机、振荡器、涡旋混匀器、Dounce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

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、细胞最好采用新鲜收集的，或者收集后立即置于-80℃保存的样本。
- 4、最好使用标准 Dounce 匀浆器匀浆，如果没有标准 Dounce 匀浆器，用普通玻璃匀浆器匀浆也可，但是核糖体回收率可能会下降。

二、操作步骤：

细胞核糖体蛋白提取

- 1、取 $1-2 \times 10^7$ 个细胞，在4℃，500-1000×g条件下离心5 分钟，小心吸取培养基，尽可能吸干，收集细胞。
- 2、用冷PBS 洗涤两次，每次洗涤后尽可能吸干上清。（在500g-1000×g条件下离心5分钟）
- 3、加入500μl-1ml 冷的试剂A，置冰上 10 分钟。
- 4、用Dounce 匀浆器匀浆 20-30 下。

【注】：

- ①标准Dounce 匀浆器用紧杵5-8次，松杵匀浆15-20次。
- ②匀浆杵一个上下来回为一次。
- ③普通玻璃匀浆器匀浆一般也不超过30 次，匀浆次数并非越多越好。
- 5、将匀浆液在4℃，1000×g条件下离心5分钟。弃沉淀，收集上清。
- 6、将上清在4℃，20000×g条件下离心10分钟，弃沉淀，收集上清。
- 7、将上清在4℃，100000×g -120000×g条件下离心60 分钟。弃上清，收集沉淀。

【注】：

- ①如果条件允许，可将离心时间延长到2-24小时。可以提高核糖体回收率。
- ②液体量较少没有合适转头时，可以将小离心管套入大离心管进行离心；或者用 PBS 补充液体量后用合适的离心管离心。
- 8、在沉淀中加入400μl 冷的试剂B，混匀。
- 9、在 4℃，100000×g -120000×g条件下离心60 分钟。

【注】：

- ①如果条件允许，可将离心时间延长到2-24 小时。可以提高核糖体回收率。
- ②液体量较少没有合适转头时，可以将小离心管套入大离心管进行离心；或者用 PBS 补充液体量后用合适的离心管离心。
- 10、弃上清，沉淀用50-100ul 核糖体提取液C 重悬。
- 11、即得到核糖体蛋白样品，置冰箱-80℃冻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℃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。

组织核糖体蛋白提取

- 1、取 50-100mg 新鲜动物组织样本，用 PBS 洗涤干净。
- 2、用剪刀尽可能剪碎，用冷 PBS 洗涤两次。（在 500g-1000×g 条件下离心 5 分钟）

3、加入 500 μ l-1ml 冷的试剂 A，置冰上 10 分钟。

4、用 Dounce 匀浆器充分匀浆 20-30 下，至无明显固体团块。然后在 4 $^{\circ}$ C，1000 $\times$ g 条件下离心 5 分钟。

【注】：

①标准Dounce 匀浆器用紧杵5-8 次，松杵匀浆15-20 次。

②匀浆杵一个上下来回为一次。

③普通玻璃匀浆器匀浆一般也不超过30 次，匀浆次数并非越多越好。

5、将上清吸入另一预冷的干净离心管。

6、将上清在4 $^{\circ}$ C，20000 $\times$ g条件下离心10 分钟，弃沉淀，收集上清。

7、将上清在4 $^{\circ}$ C，100000 $\times$ g -120000 $\times$ g条件下离心60 分钟。弃上清，收集沉淀。

【注】：

①如果条件允许，可将离心时间延长到2-24 小时。可以提高核糖体回收率。

②液体量较少没有合适转头时，可以将小离心管套入大离心管进行离心；或者用 PBS 补充液体量后用合适的离心管离心。

8、在沉淀中加入400 μ l 冷的试剂B，混匀。

9、在4 $^{\circ}$ C，100000 $\times$ g -120000 $\times$ g条件下离心60分钟。

【注】：

①如果条件允许，可将离心时间延长到2-24小时。可以提高核糖体回收率。

②液体量较少没有合适转头时，可以将小离心管套入大离心管进行离心；或者用 PBS 补充液体量后用合适的离心管离心。

10、弃上清，沉淀用50-100 μ l 核糖体提取液C重悬。

11、即得到核糖体蛋白样品，置冰箱-80 $^{\circ}$ C冻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 $^{\circ}$ 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。

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。