Beijing Solarbio Science & Technology Co., Ltd
Tel: 400-968-6088
Fax: 010-56371281
Http://www.solarbio.com

# 总蛋白提取试剂盒（蛋白相互作用适用（Pull-down、co-IP 等））

**货号：**EX1100

**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 |
|---|---|---|---|
| 试剂 A：总蛋白提取液 A | 25ml | 50ml | 2-8℃保存 |
| 试剂 B：蛋白酶抑制剂混合物 B | 100ul | 200ul | -20℃保存 |
| 试剂 C：磷酸酶抑制剂混合物 C | 100ul | 200ul | 2-8℃保存 |

***注：***

1. 蛋白酶抑制剂未开盖使用前也可以2-8℃储存。开盖使用后-20℃储存。
2. 蛋白酶抑制剂在2-8℃低温时是固体状态，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。
3. 试剂拆封后请尽快使用完！

**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动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Pull-down、IP等蛋白相互作用研究，也可以用于WB、蛋白质电泳、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，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。

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。也可以将最后样品用脱盐柱脱盐处理后再用于2D电泳。

本试剂盒按每个处理样本50mg细胞/组织计（大约50μl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（$10^7$个细胞）的总蛋白质产量大约为6mg左右。

**自备试剂和仪器**

离心机、振荡器、匀浆机/匀浆器、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

**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、提取过程简单方便，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。

5、总蛋白提取液含多种有效成分，可以充分释放胞浆蛋白、核蛋白和膜蛋白，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剂 AEBSF、Aprotinin、Leupeptin、PepstatinA、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。

**使用方法：**

**一、使用注意事项：**

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. 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。
4. 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。
5. 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。
6. 可以根据自己实验需要加入其它蛋白酶抑制剂单品。
7. 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。
8. 禁止与其他品牌的试剂混用，否则会影响使用效果。
9. 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。
10. Western Blot实验内参可以选用beta-actin、GAPDH、Tubulin。

**二、操作步骤**

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冷的总蛋白提取液中加入2μl蛋白酶抑制剂混合物和2μl磷酸酶抑制剂混合物，混匀后置冰上备用。

2．细胞蛋白提取

（1）取5×$10^6$个细胞，在4℃，2500×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洗涤细胞两次，每次洗涤后尽可能吸干上清。

（3）每5×$10^6$—1×$10^7$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20-30分钟，至细胞充分裂解，无明显细胞沉淀。

（4）在4℃，12000×g条件下离心15分钟。

（5）将上清吸入另一预冷的干净离心管，即可得到总蛋白。

（6）将上述蛋白提取物定量后分装于-80℃冰箱保存备用或直接用于下游实验。

**贴壁细胞蛋白提取：**

1、提取液准备：

每500μl冷的总蛋白提取液中加入2μl蛋白酶抑制剂混合物和2μl磷酸酶抑制剂混合物，混匀后置冰上备用。

2．细胞蛋白提取

（1）小心吸取贴壁细胞的培养液。

（2）用冷PBS洗涤细胞两次，每次洗涤后尽可能吸干上清。

（3）加入适量冷的总蛋白提取液，振荡15-30分钟，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。

（4）在4℃，12000×g条件下离心15分钟。

（5）将上清吸入另一预冷的干净离心管，即可得到总蛋白。

（6）将上述蛋白提取物定量后分装于-80℃冰箱保存备用或直接用于下游实验。

**组织样本总蛋白提取：**

1、提取液准备：

每500μl冷的总蛋白提取液中加入2μl蛋白酶抑制剂混合物和2μl磷酸酶抑制剂混合物，混匀后置冰上备用。

2．组织蛋白提取

（1）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500μl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。

（2）将组织匀浆吸入一预冷的干净离心管中，在4℃条件下振荡10-20分钟。

（3）在4℃，12000×g条件下离心15分钟。

（4）将上清吸入另一预冷的干净离心管，即可得到总蛋白。

（5）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。

③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。

④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/10秒间隔10秒，超声3分钟，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。

⑤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。

**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。