



动物组织/细胞总蛋白提取试剂盒（柱式法）

货号: BC3790

规格: 50T

保存: RT, 1 年。

应用: 可用于动物细胞和组织的总蛋白样品制备, 适用于 SDS-PAGE, WB 等下游应用

试剂盒组份:

组份	规格
变性细胞裂解液	25mL
离心管柱	50 个
收集管	50 个
塑料研磨棒	2 根

产品说明:

动物细胞/组织总蛋白提取试剂盒, 是新一代超快速蛋白质提取工具。越来越多的证据表明最常用的 RIPA 缓冲液可能导致蛋白质的随机损失, 产生很多难以解释的疑难数据。本试剂盒使用离心管柱提取技术结合优化的裂解缓冲液可以更快、更有效地提取总蛋白, 使 WB 结果更加准确。使用离心管柱提取蛋白, 提取体系最低可以低至 20 μ L, 有效的解决了小样本量的样本。

知识点:

1. 蛋白酶抑制剂不是必须加入, 但是如果下游实验需要较长时间或者蛋白提取后保存较长时间, 建议添加蛋白酶抑制剂。推荐使用 BCA 试剂盒用于蛋白浓度测定。研究蛋白磷酸化, 磷酸酶抑制剂应在使用前加入裂解缓冲液。

2. 做 WB 上样前, 仍需和 loading buffer 混匀煮制样品。

操作方法 (仅供参考):

细胞样品总蛋白提取:

A. 非贴壁细胞

1. 将离心管柱及接收管套管放在冰上预冷。

2. 低速离心收集细胞, 在 1.5mL 离心管中加入预冷的 PBS, 旋窝震荡, 500 $\times$ g 离心 2-3 分钟清洗细胞。吸去上清, 剩余与细胞体积相同体积的 PBS。涡旋震荡重悬细胞。

3. 加入表格 1 中相应体积的细胞裂解液, 涡旋震荡裂解细胞。(细胞数量和裂解液须保证对应关系, 以达到最佳提取效率) 请注意: 部分未完全裂解的细胞不会影响样品质量。

4. 将裂解的细胞转移到预冷的离心管柱套管中, 14000-16000 $\times$ g 离心 30 秒取出。

5. 立刻将收集管放置于冰上, 弃去离心管柱, 蛋白提取完成可应用于下游实验。

表 1. 不同细胞体积应加入相应体积裂解液

细胞体积 (μL)	裂解液 (μL)	相当细胞量×10 ⁶
3	20	0.3
5	50	0.5
10	100	1
20	200	2
40	500	3

B.贴壁细胞

- 1.将离心管柱及接收管套管放在冰上预冷
- 2.将预冷的 PBS 直接加入培养板，培养皿或培养瓶中清洗贴壁细胞，吸去上清。
- 3.按照表 2 中将相应体积的细胞裂解液均匀的加入整个器皿表面，用移液器吹打几次，将裂解的细胞转移到预冷的离心管柱套管中，14000-16000×g 离心 30 秒取出。（如提取浓度不佳，可减少裂解液使用量）
- 4.立刻将收集管放置于冰上，弃去离心管柱，蛋白提取完成可应用于下游实验。

表格 2. 不同贴壁细胞量应加入相应体积裂解液

器皿	细胞数量	裂解液 (μL)
24 孔板	0.1-0.2×10 ⁶	50
6 孔板	0.6-0.8×10 ⁶	200
25 cm ² 培养瓶	1.5-2×10 ⁶	500

动物组织总蛋白提取：

以下步骤是从 15-20mg 组织中提取。如果起始量较大或者较小，需调整相应裂解液的用量比例。

1. 将离心管柱及接收管套管放在冰上预冷
2. 取 15-20mg 组织放置于洁净 EP 管中，用塑料研磨棒扭转研磨 50-60 次，加入 200μL 细胞裂解液，继续研磨 30-60 次，密封室温孵育 1-2 分钟后得到组织裂解混合物。（组织用量不要过量，无需过度研磨，裂解液可分两次加入以得到最佳效果）

注意：塑料研磨棒可以重复使用，用蒸馏水彻底冲洗干净，用纸巾擦干。

3. 吸取全部组织裂解混合物放入离心管柱中，插入接收管，14000-16000×g 离心 1-2 分钟取出。收集管里的上清是抽提的变性总蛋白。

请注意：部分未完全裂解的组织不会影响样品质量。

常见问题

问题	解决方案
裂解物太粘稠，无法用 00-1000μL 吸头吹打	将细胞裂解物倒入离心管柱中或将吸头剪掉尖端
离心 30 秒后离心管中还存留细胞裂解液	减少起始细胞/组织的数量或增加细胞裂解液
低蛋白浓度	增加起始细胞/组织的数量或减少细胞裂解液量
高分子量范围（100-300KDa）蛋白条带弱	增加细胞裂解液确保细胞/组织裂解充分