



精子蛋白提取试剂盒

货号: EX1620

规格: 50T/100T

有效期: 2-8℃保存, 有效期 1 年。

产品内容:

名称	50T	100T	储存条件
组分 A: 精子蛋白提取液 A	25ml	50ml	2-8℃保存
组分 B: 精子蛋白提取液 B	25ml	50ml	2-8℃保存
组分 C: 蛋白酶抑制剂混合物 C	100μl	200μl	-20℃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:

精子总蛋白提取试剂盒提供全套试剂, 适用于从各种动物精液样品中提取总蛋白。

本试剂盒含有的独特配方能够有效溶解膜组份。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, 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。

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、Pepstatin A、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、丙氨酸-氨基肽酶等。

使用方法：

一、使用注意事项：

1. 预实验很重要。必须要做预实验，在正式实验之前取少量样本优化实验条件，并像正式样本一样认真进行，看实验结果是否可行，实验条件是否适合自己的样本。由于生物样本的多样性，不同样本的实验条件通常差异较大，同种细胞的不同模型下需要的实验条件也可能不同，为了避免浪费正式样本和试剂，一定要提前预实验优化实验条件。
2. 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。
3. 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。
4. 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。
5. 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。
6. 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。
7. 可以根据自己实验需要加入其它蛋白酶抑制剂单品。
8. 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。
9. Western Blot实验内参可以选用beta-actin、GAPDH、Tubulin。
10. 离心机转速有相对离心力（RCF，×g）和每分钟转速（RPM）两种表示方式，有些离心机设置有RPM和×g显示切换，但部分离心机没有自动切换功能。需要用下面的公式进行换算：
$$g=r \times 1.118 \times 10^{-5} \times \text{rpm}^2$$
（r为有效离心半径，即从离心机轴心到离心收集管底部中心位置的长度，单位为厘米）例如：转速为3000rpm，有效离心半径为10 cm，则相对离心力（RCF，×g）为
$$=10 \times 1.118 \times 10^{-5} \times 3000^2 = 1006.2 \text{ (} \times g \text{)}。$$

二、操作步骤

1. 提取液制备：

每 500μl 冷的蛋白提取液 B 中加入 2μl 蛋白酶抑制剂混合物，混匀后置冰上备用。

【注】：

- 1) 根据需要处理的样品数量准备蛋白提取液，蛋白酶抑制剂混合物不可以一次全部加入提取液。
 - 2) 加过蛋白酶抑制剂的提取液一周内未使用完，再次使用前需要再次加入蛋白酶抑制剂。
 - 3) 蛋白样品用于测定某些细胞内蛋白酶活性等下游实验时，注意根据实际情况调整抑制剂混合物是否加入。
 - 4) 以下步骤中使用的蛋白提取液为此步配制好的含蛋白酶抑制剂的提取液。
2. 取 0.5ml-1ml 新鲜精液，在室温或 37℃静置 30-60 分钟。
 3. 在完全液化的精液中加入 0.5ml 提取液 A，充分混匀。

4. 在 4°C, 3000×g 条件下离心 15 分钟, 小心吸取上清, 尽可能吸干, 留沉淀。
5. 在沉淀中加入 500μl 冷的蛋白提取液 B, 吹打混匀后, 在 4°C 条件下振荡 20-40 分钟。

【注】:

- 1) 使用振荡器/摇床的较低转速, 提取液能轻微晃动即可。
 - 2) 没有振荡条件也可以不振荡, 稍微延长提取液的处理时间, 中间每隔几分钟用移液器吹打混匀即可。
6. 在 4°C, 12000×g 条件下离心 5 分钟。
 7. 将上清吸入另一预冷的干净离心管, 即可得到精子总蛋白。
 8. 将上述蛋白提取物定量后分装于-80°C冰箱保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°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。

常见问题分析:

1.精子裂解速度慢?

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。

2. 蛋白浓度低?

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B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。

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。也可以加入Benzonase核酸酶处理提高蛋白回收率。

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. 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。