

高尔基体膜蛋白提取试剂盒

货号: EX1250

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: 高尔基体膜蛋白提取液 A | 25ml | 50ml | 2-8℃保存 |
| 试剂 B: 高尔基体膜蛋白提取液 B | 25ml | 50ml | |
| 试剂 C: 高尔基体膜蛋白提取液 C | 10ml | 20ml | |
| 试剂 D: 高尔基体膜蛋白提取液 D | 10ml | 20ml | |
| 试剂 E: 蛋白酶抑制剂混合物 | 100ul | 200ul | -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:

高尔基体膜蛋白提取试剂盒可用于各种动物细胞和实体软、硬组织样本的高尔基体膜蛋白的提取。

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。

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。
- 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. 最好使用Dounce匀浆器匀浆，如果没有Dounce匀浆器，也可用普通玻璃匀浆器匀浆，但是高尔基体蛋白回收率会下降。
5. 用Dounce匀浆器匀浆是高尔基体膜蛋白提取的关键的步骤，故匀浆前最好先通过预实验确定不同组织样本的最适匀浆次数，方法是每匀浆5-10次后，取2-3 μ l匀浆液到载玻片上，然后在相差显微镜下观察，完整细胞数量降低到20%以下为佳。此镜检步骤非必须步骤，但是会影响高尔基体膜蛋白的回收率。在样本极难获取的实验中，务必做镜检。
6. 提取液C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。
7. 膜蛋白电泳时loading buffer应该避免煮沸。
8. 膜蛋白电泳时可以提高loading buffer的SDS含量。
9. 禁止与其他品牌的试剂混用，否则会影响使用效果。
10. 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。

二、操作步骤

提取液准备：

每200ul冷的蛋白提取液C中加入1ul蛋白酶抑制剂混合物，混匀后置冰上备用。

每200ul冷的蛋白提取液D中加入1ul蛋白酶抑制剂混合物，混匀后置冰上备用。

细胞高尔基体膜蛋白提取

- 1.取1—2 $\times 10^7$ 个细胞，在4℃，500 $\times g$ 条件下离心2-3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。
- 3.加入500ul冷的试剂A，置冰上10分钟。
- 4.用Dounce匀浆器匀浆充分匀浆。
- 5.然后在4℃，1000 $\times g$ 力条件下离心5分钟。
- 6.弃沉淀，将上清吸入另一预冷的干净离心管。
- 7.在4℃，3000 $\times g$ 力条件下离心10分钟。
- 8.弃沉淀，将上清吸入另一预冷的干净离心管。
- 9.在4℃，10000 $\times g$ 力条件下离心10分钟。
- 10.弃沉淀，将上清吸入另一预冷的干净离心管。
- 11.在4℃，25000 $\times g$ 力条件下离心30分钟。弃上清。
- 12.在沉淀中加入400ul冷的试剂B，混匀。

- 13.在4°C, 25000×g力条件下离心30分钟。
- 14.弃上清, 沉淀中加入100-200ul冷的蛋白提取液C, 充分混匀。
- 15.在2-8°C条件下振荡30-40分钟, 至沉淀充分裂解, 无明显沉淀。
- 16.在4°C, 12000×g条件下离心5分钟。弃沉淀, 收集上清。
- 17.将上清吸入另一干净离心管, 在37°C水浴10分钟。
- 18.在37°C, 1000×g力离心5分钟, 此时溶液分为两层, 下层是膜蛋白约为20-30ul。
- 19.小心移除上层液体, 收集上层部分留作备用分析。
- 20.用50-100ul冷的试剂D膜蛋白溶解液溶解下层高尔基体膜蛋白部分, 即得高尔基体膜蛋白。
- 21.将高尔基体膜蛋白样品, 置冰箱备用或直接用于下游实验。

组织高尔基体膜蛋白提取:

- 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。
- 3.加入500ul冷的试剂A, 置冰上10分钟。
- 4.用Dounce匀浆器充分匀浆30-40下, 至无明显固体团块。
- 5.然后在4°C, 1000×g力条件下离心5分钟。
- 6.弃沉淀, 将上清吸入另一预冷的干净离心管。
- 7.在4°C, 3000×g力条件下离心10分钟。
- 8.弃沉淀, 将上清吸入另一预冷的干净离心管。
- 9.在4°C, 10000×g力条件下离心10分钟。
- 10.弃沉淀, 将上清吸入另一预冷的干净离心管。
- 11.在4°C, 25000×g力条件下离心30分钟。弃上清。
- 12.在沉淀中加入400ul冷的试剂B, 混匀。
- 13.在4°C, 25000×g力条件下离心30分钟。
- 14.弃上清, 沉淀中加入100-200ul冷的蛋白提取液C, 充分混匀。
- 15.在4°C条件下振荡30-40分钟, 至沉淀充分裂解, 无明显沉淀。
- 16.在4°C, 12000×g条件下离心5分钟。弃沉淀, 收集上清。
- 17.将上清吸入另一干净离心管, 在37°C水浴10分钟。
- 18.在37°C, 1000×g力离心5分钟, 此时溶液分为两层, 下层是膜蛋白约为20-30ul。
- 19.小心移除上层液体, 收集上层部分留作备用分析。
- 20.用50-100ul冷的试剂D膜蛋白溶解液溶解下层高尔基体膜蛋白部分, 即得高尔基体膜蛋白。
- 21.将高尔基体膜蛋白样品, 置冰箱备用或直接用于下游实验。

注:

①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C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。

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。