

酵母线粒体膜蛋白提取试剂盒

货号: EX2130

规格: 50T/100T

有效期: 2-8°C保存, 有效期一年。

产品内容:

名称	50T	100T	储存条件
组分 A: 酵母线粒体提取液 A	20ml	40ml	2-8°C保存
组分 B: 酵母线粒体提取液 B	25ml	50ml	2-8°C保存
组分 C: 酵母线粒体提取液 C	40ml	80ml	2-8°C保存
组分 D: 膜蛋白提取液 D	25ml	50ml	2-8°C保存
组分 E: 膜蛋白溶解液 E	20ml	40ml	2-8°C保存
组分 F: 蛋白酶抑制剂混合物	100ul	200ul	-20°C保存

注:

1. 蛋白酶抑制剂未开盖使用前也可以2-8°C储存。开盖使用后-20°C储存。
2. 蛋白酶抑制剂在2-8°C低温时是固体状态, 从冰箱取出后恢复至室温或37°C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:

酵母线粒体膜蛋白提取试剂盒提供全套试剂, 适用于从各种酵母样本中提取线粒体膜蛋白。提取过程简单方便。

本试剂盒含有的独特配方能够有效溶解线粒体膜组份。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。

本试剂盒提取的线粒体膜蛋白可用于Western Blotting、蛋白质电泳、免疫沉淀、ELISA、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。

本试剂盒提取的膜蛋白样本含有高浓度的盐成分, 不可直接用于2D电泳, 需要透析、脱盐后再用于2D电泳。

自备试剂和仪器:

离心机、振荡器、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

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°C冰箱预冷。整个过程须保持样品处于低温。
4. 提取液D在使用前须一直置于2-8°C条件，否则下游膜蛋白提取时会导致不容易分层。
5. 膜蛋白电泳时loading buffer应该避免煮沸。
6. 膜蛋白电泳时可以提高 loading buffer的SDS含量。

二、酵母线粒体膜蛋白提取：

1. 提取液制备：

每 500 μ l 冷的酵母线粒体膜蛋白提取液 D 中加入 2 μ l 蛋白酶抑制剂混合物，混匀后置冰上备用。

2. 取适量酵母培养物，在 4°C，1000 \times g 条件下离心 5-10 分钟，小心吸取培养基，尽可能吸干，收集酵母沉淀。
3. 用 PBS 洗涤酵母两次，每次洗涤后尽可能吸干上清。
4. 每 100-200ul 体积或 100-200mg 湿重酵母沉淀物中加入 400ul 酵母线粒体提取液 A，混匀后，在 30°C条件下保温 15 分钟。
5. 在 1000 \times g 条件下离心 5-10 分钟，收集酵母沉淀。
6. 酵母沉淀物中加入 500ul 酵母线粒体提取液 B，充分混匀后。
7. 在 37°C或室温条件下轻微振荡 30-90 分钟。
8. 在 2000 \times g 条件下离心 5-10 分钟，弃上清，收集沉淀。
9. 沉淀用 PBS 洗涤两次。离心收集沉淀。
10. 在沉淀中加入 800 μ l 酵母线粒体提取液 C，充分混匀，然后在振荡器上振荡 15-30 分钟。
11. 在 4°C，500 \times g 条件下离心 5 分钟，弃沉淀，收集上清。
12. 将上清在 4°C，1000 \times g 条件下离心 5 分钟，弃沉淀，收集上清。
13. 将上清在 4°C，14000 \times g 条件下离心 20 分钟。弃上清，收集沉淀。
14. 在沉淀中加入 200-400 μ l 冷的线粒体膜蛋白提取液 D，充分混匀。
15. 在 2-8°C条件下振荡 20-40 分钟。
16. 在 4°C，12000 \times g 条件下离心 5 分钟。
17. 将上清吸入另一干净离心管，在 37°C水浴 5-10 分钟。
18. 在 37°C，1000 \times g 条件下离心 5 分钟，此时溶液分为 2 层，小心移除上层部分，下层即为线粒体膜蛋白，约为 20-40ul。
19. 用 50-100ul 膜蛋白溶解液 E 溶解下层，即得酵母线粒体膜蛋白样品。
20. 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。

常见问题分析：

1. 蛋白浓度低？

酵母线粒体膜蛋白丰度较低，条件允许的情况下，需要尽可能加大细胞的上样量以提高膜蛋白浓度。处理部分酵母细胞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BCD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BC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。

4. 膜蛋白电泳没有条带？

膜蛋白样品通常浓度较低，电泳前一定要进行蛋白定量，以保证电泳是蛋白上样量足够。

膜蛋白提取好后，用溶解液充分溶解后，可以超声处理一下，再进行蛋白定量。

蛋白加Loading buffer后可以不用煮沸，采用50℃保温30分钟。

蛋白Loading buffer中SDS终浓度含量可以提高至3%-10%。

有些样品的膜蛋白含量太低，可以使用丙酮沉淀膜蛋白，再使膜蛋白溶解于上样缓冲液中，一般可以跑出清晰的蛋白条带。

电泳时最好采用低电压低电流电泳。

膜蛋白丰度通常较低，有条件可以尝试用银染染色。

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。
5. 如果试剂不小心接触皮肤或眼睛，应立即用水冲洗。