

溶酶体蛋白提取试剂盒

货号: EX1230

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: 溶酶体提取液 A	50ml	100ml	2-8℃保存
试剂 B: 溶酶体提取液 B	25ml	50ml	
试剂 C: 溶酶体蛋白提取 C	10ml	20ml	
试剂 D: 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:

溶酶体是由一层单位膜包围, 内含多种酸性水解酶的泡状结构。溶酶体含有40多种水解酶, 其中包括蛋白酶、核酸降解酶和糖苷酶等。其主要功能是对细胞内物质的消化作用。此外溶酶体与器官形成、激素分泌的调节以及某些疾病的发生密切相关。

溶酶体蛋白提取试剂盒提供全套试剂, 可用于各种动物细胞和实体软、硬组织样本的溶酶体蛋白提取。适用于从各种原代或传代细胞和各种实体组织, 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中提取溶酶体总蛋白。

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。

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. 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。

二、操作步骤

提取液准备：

每200ul冷的蛋白提取液C中加入2ul蛋白酶抑制剂混合物，混匀后置冰上备用。

细胞溶酶体蛋白提取

- 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-1000ul冷的试剂A，置冰上振荡10分钟。
- 4.用Dounce匀浆器匀浆30-40下。
- 5.在4℃， $1000 \times g$ 条件下离心5分钟，弃沉淀，留上清。
- 6.将上清在4℃， $4000 \times g$ 条件下离心10分钟，弃沉淀，留上清。
- 7.将上清在4℃， $20000 \times g$ 条件下离心20分钟，弃上清，留沉淀。
- 8.在沉淀中加入500ul冷的试剂B，混匀。
- 9.在4℃， $20000 \times g$ 条件下离心20分钟，弃上清，留沉淀。
- 10.在沉淀中加入100-200ul蛋白提取液C，充分混匀。
- 11.轻微振荡15-30分钟。
- 12.在4℃， $12000 \times g$ 条件下离心15分钟。

13.将上清吸入另一预冷的干净离心管，即得到溶酶体总蛋白。

14.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。

组织溶酶体蛋白提取：

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-1000ul冷的试剂A，置冰上10分钟。

4.用Dounce匀浆器匀浆30-40下，至无明显可见固体。

5.在4℃，1000×g条件下离心5分钟，弃沉淀，留上清。

6.将上清在4℃，4000×g条件下离心10分钟，弃沉淀，留上清。

7.将上清在4℃，20000×g条件下离心20分钟，弃上清，留沉淀。

8.在沉淀中加入500ul冷的试剂B，混匀。

9.在4℃，20000×g条件下离心20分钟，弃上清，留沉淀。

10.在沉淀中加入100-200ul蛋白提取液C，充分混匀。

11.轻微振荡15-30分钟。

12.在4℃，12000×g条件下离心15分钟。

13.将上清吸入另一预冷的干净离心管，即得到溶酶体总蛋白。

14.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？

溶酶体蛋白丰度较低，需要足够的样品量才能得到足够的蛋白，在条件允许的情况下，适当增加细胞或组织样本的上样量。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。