总蛋白提取试剂盒 (Total Protein Extraction Kit)

P1250：蛋白抽提试剂盒-I (实体组织和细胞蛋白抽提, 100 extractions)

描述：从组织细胞中提取总蛋白是 Western Blot 的关键步骤。实体软组织如脑脊髓富含磷脂，神经血管含大量结缔组织，而脂肪则含有大量油脂，常规的方法难以有效从这些组织中提取蛋白。本试剂盒为组织或培养细胞总蛋白提取提供完整的解决方案。用裂解-结合缓冲液匀浆裂解实体组织，或直接用裂解-结合缓冲液重悬培养细胞，然后加入抽提试剂去除非蛋白成分，离心、干燥后即可得到总蛋白。蛋白沉淀溶解后用常规方法进行蛋白定量。提取过程可在 30-60 分钟内完成，可在 1.5ml 离心管微量提取也可大规模制备，极为简便高效。通常一次提取 10-100mg 组织或 1 x 10^7 细胞所获得的总蛋白可进行几十到上百次分析，如蛋白质电泳、Western Blot、免疫共沉淀、制备 2-D 胶样品。

组成

1. 裂解-结合缓冲液 100 ml 2. 抽提试剂 100 ml

每毫升裂解缓冲液和抽提试剂可提取 10-100 mg 组织或 1 × 10^7 细胞。试剂盒的裂解缓冲液是过量的。

适用 各种实体软组织(> 1 mg)，如脑、脊髓、神经结或纤维、脂肪、肝脏、消化道组织、肾脏、心脏、肌肉、血管、结缔组织等，各种原代细胞和永生化细胞系。

保存：室温或 4ºC 保存 2 年

固体组织蛋白提取

1 每 10-100mg 固体组织剪碎后加入 0.5-1 ml 裂解液，放入玻璃匀浆器内上下手动匀浆 15 次；或用高速机械匀浆器 12,000 rpm 破碎组织。少量小的未破碎组织不影响后续抽提。*注意：肝肾脾组织蛋白含量高，提取时应加较少量的组织，一般不超过 50 mg，否则形成的蛋白膜厚、致密且难溶。*

2 仅取 0.5ml 组织匀浆液转移到 1.5ml 离心管，弃去剩余的组织匀浆液。每 0.5ml 组织匀浆液加入 2 倍体积的(1 ml)抽提试剂充分混匀。室温或 4ºC 静置 10 分钟，偶尔晃动。*注意：(1)如组织量<10mg，在下一步离心时形成的蛋白膜易碎，静置 30min 有助蛋白膜形成。(2)提取脂肪组织时应 4ºC 静置 40min 以上以充分去除油脂。(3) 0.5ml 组织匀浆液获得的蛋白足以进行几十次 Western Blot。保证每 0.5ml 组织匀浆液加入 2 倍体积的(1 ml)抽提试剂是成功的关键。*

3 10,000 × g 4ºC 离心 10 分钟，溶液分为上下两相，两相中间为蛋白膜。吸除上层液体；随后用吸头或针头轻轻拨开蛋白膜，吸除下层液体。蛋白膜将附着于离心管壁。*注意：(1)离心速度过高将使蛋白膜过于坚固，难以溶解。(2)如果不能分相，可再加入 50µl 蒸馏水混匀离心。 (3)如果初始组织量较少(<10mg)，离心后难以得到完整的蛋白膜，此时可吸去上下层液体，加入 1ml 纯乙醇混匀，10,000 × g 4ºC 离心 3 分钟。弃所有液体，蛋白沉淀在管底。*

4 敞开管口，室温空气干燥沉淀。未溶解的蛋白沉淀不含盐、去垢剂、和还原剂成分，可 4ºC 或－20ºC 一年以上。

培养细胞蛋白提取 (参见固体组织蛋白提取程序中的斜体字注解)

1. 消化洗涤并 800 g 离心收集细胞。每 5-10 × 10^6 细胞加入 0.5 ml 裂解液，振荡重悬，4ºC 净置 2 分钟。
2. 按比例每 0.5 ml 裂解液加入 1 ml 抽提试剂，振荡混匀。4ºC 静置 10min。
3. 10,000g 4ºC 离心 10 分钟，溶液分为两相，两相中间为蛋白膜。小心吸除上层相和大部分下层相，保留两相中间的蛋白絮状物。如果不能分相，可再加入 50µl 蒸馏水混匀离心。
4. 加入 1 ml 纯乙醇洗涤沉淀。10,000g 4ºC 离心 3 分钟，蛋白沉淀在管底。
5. 去除管中所有液体，敞开管口，室温空气干燥蛋白沉淀。未溶解的蛋白沉淀不含盐、去垢剂、和还原剂成分，可 4ºC 或－20ºC 一年以上。

蛋白沉淀溶解与 SDS-PAGE 上样：

1. 沉淀溶解体积：每 1 mg 起始组织溶于 2~5 µl 的终体积；每 1 x 10^6 细胞获得的沉淀溶于 50-200 µl，可获得很高的蛋白浓度。最后样品中的蛋白浓度可用每单位体积(ml)内的组织初始重量(mg)或细胞数量来校正和表示，这种校正方法与实际的蛋白定量结果相比有很好的平行性，也符合科学论文的表示惯例，可免去后续的蛋白定量之烦扰。
2. 溶解：采用以下方法之一溶解蛋白沉淀：
   (1) 对于 Western Blot 检测目的，加入适量体积的 2% SDS 水溶液、或直接加入标准的 1 × SDS-PAGE 样品缓冲液(62 mM Tris-Cl pH6.8，2%SDS，2% Beta-巯基乙醇，10 %甘油, 0.04%溴酚兰)。这是最有效的溶解方法，但如

需进行蛋白定量，只能用 2% SDS 溶液溶解沉淀并采用 BCA 方法进行蛋白定量。如果是疏水蛋白丰富的植物和细菌组织提取物，可用 4% SDS 水溶液溶解。

(2) 如果确知欲检测的目的蛋白是可溶性蛋白，可用蒸馏水或自备的其它缓冲液溶解沉淀。其优点是不干扰后续的蛋白定量，缺点是在没有去垢剂存在的情况下沉淀溶解缓慢且某些膜/疏水蛋白不能完全溶解。

(3) 制备 2-D 胶样品时，使用 2-D 胶样品缓冲液溶解，直接进行下面的步骤 4，无需加热变性。

3. 95ºC 煮 10 分钟。在 SDS 存在的情况下，加热将使染色体 DNA 变性形成高度粘稠物。加热－剧烈振荡－室温冷却，再加热－振荡－室温冷却，或者用接 1 ml 注射器的细针头反复抽吸，有助于彻底打断 DNA，降低粘度。
4. 室温放置 30 分钟，或者 4ºC 放置 2 小时或过夜。沉淀量少时可完全溶解。**特别提示：**大块的沉淀通常看似不能完全溶解，但实际上绝大部分细胞结构蛋白已经溶解出来，残留下的只是“空壳”，肝肾组织提取物尤为明显。过夜后的不溶物主要包含不溶性结缔组织、胶原蛋白、各种组织基质。此步骤的不溶物，再次用 10% SDS 溶解检测，基本不含实验有用的可检测蛋白，提示用户无需为此担心。
5. 12000 rpm 离心 5 min。取蛋白上清，放心地弃去任何不溶性沉淀。不溶性沉淀留置于管内并不影响实验。
6. 凝胶上样：如果上述步骤 2 的沉淀是直接溶于 SDS-PAGE 样品缓冲液，可直接凝胶上样。否则，应取 1 份样品上清与 1 份 1 × SDS-PAGE 样品缓冲液(50 mM 或 62 mM Tris-Cl pH6.8，2%SDS，2% Beta-巯基乙醇或 100mM DTT，10 %甘油, 0.04%溴酚兰)，1:1 混合后上样。

说明

1. 按照上述提取和溶解过程，不加蛋白酶抑制剂，而蛋白不会有明显降解，用户不必(但可以)加入蛋白酶抑制剂。
2. 蛋白定量。注意使 SDS 浓度稀释到不影响蛋白定量的水平，或选择不受 SDS 影响的 BCA 定量方法。BCA 法<5% SDS 浓度，Bradford 法<0.125% SDS 浓度。
3. 按比例可进行大规模的(多至 1 g) 组织蛋白提取。
4. 提取试剂对眼睛和呼吸系统有一定刺激性，皮肤不慎接触可用水清洗。

相关产品

1. Western Blot SuperECL 超敏发光液
2. 中、宽范围蓝色蛋白预染分子量 Marker
3. 10 分钟 SDS-PAGE 凝胶快速高灵敏染色
4. Western Blot 膜再生液、Western Blot 膜高效封闭剂 、Western Blot 膜 10 秒钟高灵敏染色液。
5. 封闭专用脱脂奶粉、蛋白电泳试剂和标准缓冲液 (Certified Electrophoresis Reagents)
6. SDS-PAGE 凝胶干胶装置 、Western Blotting 蛋白条带 X 线胶片定位标签
7. 截留<5 kDa 小蛋白的 ImBlotter-NC 硝酸纤维素膜
8. 核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒、变性-非变性细胞裂解产物制备试剂盒
9. 膜/疏水蛋白-可溶性蛋白双相分离试剂
10. 线粒体制备试剂盒、细胞核制备试剂盒