

柱式法 WB 专用

动物细胞和组织总蛋白提取试剂盒

描述：

柱式法动物细胞/组织总蛋白提取试剂盒，是新一代超快速蛋白质提取工具。越来越多的证据表明最常用的 RIPA 缓冲液可能导致蛋白质的随机丢失，产生很多难以解释的疑难数据。本试剂盒使用离心管柱提取技术结合优化的裂解缓冲液可以更快速，更有效地提取总蛋白，使 WB 结果更加准确。使用离心管柱技术提取蛋白，提取体系最低可以低至 20 μ l——有效解决小样本量的样本。

应用：

本试剂盒可用于动物细胞和组织的总蛋白样品制备，适用于 SDS-PAGE, WB 等下游应用。

试剂盒组分

1. 25ml 变性细胞裂解液
2. 50 个离心管柱
3. 50 个收集管
4. 2 根塑料研磨棒

****注：** 上述细胞裂解缓冲液不含任何还原剂和伯胺， 建议使用 BCA 法测定提取的蛋白浓度

运输储存：

常温

重要产品信息

- 1. 蛋白酶抑制剂不是必须加入，但是如果下游实验需要较长时间或者蛋白提取后保存较长时间，建议添加蛋白酶抑制剂。推荐使用 BCA 试剂盒用于蛋白浓度测定。研究蛋白磷酸化，磷酸酶抑制剂（例如 罗氏的磷酸酶抑制剂）应在使用前加入裂解缓冲液。**
- 2. 做 WB 上样前，仍需和 loading buffer混匀煮制样品。**

所需附加材料

1 X PBS

涡旋震荡仪

台式离心机

BCA 蛋白定量试剂盒

操作方法：

联系电话：13524666836（微信同号）

细胞样品总蛋白提取

A. 非贴壁细胞

- 1.将离心管柱及接收管套管放在冰上预冷。
- 2.低速离心收集细胞，在 1.5ml 离心管中加入预冷的 PBS，旋窝震荡,500xg 离心 2-3 分钟清洗细胞。吸去上清，剩余与细胞体积相同体积的 PBS。涡旋震荡重悬细胞。
- 3.加入表格 1 中相应体积的细胞裂解液，涡旋震荡裂解细胞。**（细胞数量和裂解液须保证对应关系，以达到最佳提取效率）** 请注意：部分未完全裂解的细胞不会影响样品质量。

表格 1，不同细胞体积应加入相应体积裂解液

细胞体积 (ul)	裂解液 (ul)	相当细胞量# X 10 ⁶
3	20	0.3
5	50	0.5
10	100	1
20	200	2
40	500	3

* NIH3T3 和 293T 细胞 10ul 体积相当于 1X10⁶ 个细胞

- 4.将裂解的细胞转移到预冷的离心管柱套管中，14000-16000xg 离心 30 秒取出。
- 5.立刻将收集管放置于冰上，弃去离心管柱，蛋白提取完成可应用于下游实验。

B. 贴壁细胞

- 1.将离心管柱及接收管套管放在冰上预冷。
- 2.将预冷的 PBS 直接加入培养板，培养皿或培养瓶中清洗贴壁细胞，吸去上清。

3.按照表 2 中将相应体积的细胞裂解液均匀的加入整个器皿表面，用移液器吹打几次，将裂解的细胞转移到预冷的离心管柱套管中，14000-16000xg 离心 30 秒取出。（如提取浓度不佳，可减少裂解液使用量）

4.立刻将收集管放置于冰上，弃去离心管柱，蛋白提取完成可应用于下游实验。

表格 2，不同贴壁细胞量应加入相应体积裂解液

器皿	细胞数量	裂解液 (ul)
24 孔板	0.1-0.2 Million	50
6 孔板	0.6-0.8 Million	200
25 cm2 培养瓶	1.5-2 Million	500

动物组织总蛋白提取

以下步骤是从 15-20mg 组织中提取。如果起始量较大或者较小，需调整相应裂解液的用量比例。

- 1.将离心管柱及接收管套管放在冰上预冷。
 - 2.将 15-20mg 新鲜/冷冻组织放置于离心管柱上，用塑料棍向下扭转反复研磨 50-60 次，加入 200ul 细胞裂解液，继续研磨 30-60 次。（组织用量不要过量，无需过度研磨，裂解液可分两次加入以得到最佳效果）注意：塑料研磨棒可以重复使用，用蒸馏水彻底冲洗干净，用纸巾擦干。
 - 3.盖上盖子室温孵育 1-2 分钟，14000-16000xg 离心 1-2 分钟取出。接收管里的上清是抽提的总蛋白。分装或转移蛋白至合适的样品管中-80 保存
- 请注意：部分未完全裂解的组织不会影响样品质量。

常见问题

问题	解决方案
裂解物太粘稠，无法用 200-1000 μ L 吸头吹打	将细胞裂解物倒入离心管柱中或将吸头剪掉尖端
离心 30 秒后离心管中还存留细胞裂解液	减少起始细胞/组织的数量或增加细胞裂解液
低蛋白浓度	增加起始细胞/组织的数量或减少细胞裂解液量
高分子量范围（100-300KDa）蛋白条带弱	增加细胞裂解液确保细胞/组织裂解充分