

产品介绍

Proteintech 通用型总蛋白提取试剂盒（PK10030）适用于提取各种动物、植物的细胞或组织样品中的总蛋白，也可以用于真菌或细菌样品中的总蛋白的提取，此款试剂盒提供的裂解液，能够高效地提取总蛋白，主要包括细胞质、细胞膜、细胞核、核基质、线粒体、内质网、高尔基体等蛋白，得到的总蛋白样品可用于蛋白免疫印迹、免疫沉淀、Co-IP、ELISA检测，蛋白质分析和小规模蛋白层析纯化等其他应用。

关于试剂盒

- 本试剂盒是一款广谱、通用型的总蛋白的提取试剂盒，可用于大部分蛋白的提取；而对于一些低表达、易降解、磷酸化修饰、疏水性蛋白等特殊蛋白质的提取推荐选用其对应的专用提取试剂盒（见下表）。
- 用于Co-IP实验的样品不要对样品进行超声波处理，也可将裂解液换成专用的Co-IP裂解液（[PR20037](#)），提升提取效果。
- 裂解液在使用前需添加新鲜的蛋白酶抑制剂混合物。
- 样品制备完成后及时使用或分装保存在-80℃。
- 试剂盒开封后，裂解液可长期保存于4-8℃，SDS-PAGE蛋白上样缓冲液（4X）推荐分装-20℃保存，试剂盒过期后建议不要使用。

名称	货号	规格
细胞总蛋白提取试剂	PK10020	30T
动物组织总蛋白提取试剂	PK10021	30T
核蛋白与胞浆蛋白抽提试剂盒	PK10014	30T
细胞膜蛋白抽提试剂	PK10015	30T
线粒体分离及蛋白提取试剂盒	PK10016	30T
组蛋白抽提试剂	PK10022	50T
磷酸化蛋白提取试剂盒	PK10023	30T
易降解蛋白提取试剂	PK10024	30T
血浆血清白蛋白去除试剂盒	PK10025	60T
外泌体分离及蛋白提取试剂盒（细胞培养上清/尿液）	PK10028	40T

产品成分

组分	规格 (50T/100T)	保存条件
裂解液	50mL/100mL	-20℃；解冻后可长期存放于4-8℃
SDS-PAGE蛋白上样缓冲液 (4X)	17mL/34mL	-20℃
普通型蛋白酶抑制剂混合物 (100X)	0.5mL/1mL	-20℃

包装规格

50T/100T

保存条件

-20℃保存，一年有效。

使用方法

1、细胞样品

- a、瓶内裂解法（效果最佳）：适用于所有的贴壁细胞**
- （1）吸净培养基，用冰的PBS清洗细胞表面2遍（动作轻柔，防止细胞脱落），尽可能吸取残留的PBS。
- （2）在冰上按每1000万细胞加入1 mL预冷的裂解液（使用前添加新鲜的蛋白酶抑制剂混合物）于细胞瓶、培养板或培养皿中，用移液管吹散贴壁的细胞，对于贴壁紧的细胞也可使用细胞刮收集，收集裂解液，在冰上放置30 min，期间每10 min上下颠倒混匀一次。
- b、离心法：适用于悬浮细胞和药物处理过的细胞**
- （1）使用细胞刮收集细胞悬液（连同培养基一起收集），4℃，500 g离心5 min，收集沉淀，沉淀用预冷的PBS洗涤两遍，收集细胞沉淀，尽可能吸取残留的PBS。
- （2）按每1000万细胞加入1 mL预冷的裂解液，在冰上放置30 min，期间每10 min上下颠倒混匀一次。
- 注：（1）细胞的收集优先使用瓶内裂解法处理，瓶内裂解法可以有效的防止细胞在离心过程中破碎，能有效的提高总蛋白得率，同时也能保留细胞外基质（ECM）。**
- （2）对于药物处理过的贴壁细胞则推荐使用离心法收集，因为药物处理过的细胞往往贴壁不牢，在PBS清洗阶段容易丢失。**
- （3）不推荐使用胰酶消化，胰酶消化细胞不仅会造成细胞外基质（ECM）的完全丢失，同时会剪切一些对胰酶敏感的蛋白。**
- （4）一些细胞粘度高（HEK-293）和密度高的悬浮细胞（Jurkat、K562等）在加入细胞裂解液后容易形成絮状物，此时应及时的使用超声破碎仪将其打散。**

2、组织样本

- a、采集与保存：**

- （1）采集组织样本前先对动物去除血液（血液去除越干净越好），接着迅速解剖，采集所需要的组织样本。
- （2）组织样本如需保存，可将采集的组织样本液氮速冻，然后转移至-80℃保存。
- （3）取样顺序：最先取胃肠道消化系统相关组织，接着取肺（巨噬细胞含量高）、肝脏（蛋白种类多）、膀胱、生殖系统相关的组织（睾丸、卵巢、子宫、输卵管等），最后取心脏、脾脏、肾脏、骨骼肌、大小脑等组织。胃肠道消化系统相关组织推荐现取现制备，选用易降解蛋白提取试剂盒（PK10024）提取。

b、清洗

- （1）对于血液含量丰富的组织样本如：心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏等组织，剪碎使用冰的PBS洗涤液清洗2-3遍（可以适当按压排出血液），直至样本血红色变浅，滤纸吸干水分称重。
- （2）对于脂肪含量丰富的组织样本，预先把样本放在几层纸巾上按压，去除部分脂类，然后再使用冰的PBS清洗1-2遍，滤纸吸干水分称重。

c、破碎及裂解

- （1）**液氮研磨法**：将剪碎的组织块在研钵中加入液氮，快速研磨至细粉状，转移至EP管中，按每100 mg组织加1 mL预冷的裂解液（使用前添加新鲜的蛋白酶抑制剂混合物），使用移液器上下吹打混匀，直至完全溶解。在冰上放置30 min，期间每10 min上下颠倒混匀一次。
 - （2）**匀浆法**：按每100 mg组织加1 mL预冷的裂解液（使用前添加新鲜的蛋白酶抑制剂混合物），将样品转移到合适大小的预冷玻璃匀浆器中，在冰浴条件下对样品匀浆30-50次。在冰上放置30 min，期间每10 min上下颠倒混匀一次。
- 注：不同的样品所需匀浆次数不同。**鉴定方法：取20 ul匀浆30次后的组织样品，加入等体积的0.4%台盼蓝溶液，混匀，在显微镜下观察台盼蓝溶液染色阳性（蓝色）细胞数目的比例，当阳性（蓝色）细胞完全破碎，即可停止匀浆。若阳性（蓝色）细胞破碎不完全，则可适当增加5-10次匀浆，随后按照同样的方法使用台盼蓝溶液进行鉴定。

- （3）**冷冻研磨机法**：提前开启冷冻研磨机预冷，将吸干水分的组织样本剪成1-2 mm左右的小块，按照每管100 mg分装到2 mL离心管，同时每管加入1粒5 mm的研磨珠。将离心管和适配器放入液氮里浸泡速冻。将离心管和适配器转移到冷冻研磨机，使用65 Hz研磨45s，如果研磨效果不理想可中断15s后重复研磨一次。每管加1 mL预冷的裂解液（使用前添加新鲜的蛋白酶抑制剂混合物），使用移液器上下吹打混匀，直至完全溶解。在冰上放置30 min，期间每10 min上下颠倒混匀一次。
- 注：（1）优先推荐选用液氮研磨法和冷冻研磨机法，其破碎效果最佳；如选用匀浆法，需在冰水浴中对样品进行匀浆。**
- （2）使用冷冻研磨机法对液氮速冻过的样本进行破碎，对离心管的材质要求比较高，需选用专用的离心管。**

3、昆虫样本

将昆虫清洗干净，使用液氮研磨法、匀浆法或冷冻研磨机法（参考组织样本的破碎及裂解方法）将其破碎，按每50-100 mg样本加1 mL预冷的裂解液（使用前添加新鲜的蛋白酶抑制剂混合物），在冰上放置30 min，期间每10 min上下颠倒混匀一次。

4、植物样本

将植物清洗干净，使用液氮研磨法或冷冻研磨机法（参考组织样本的破碎及裂解方法）将其破碎（越碎越好），按每100-200 mg样本加1 mL预冷的裂解液（使用前添加新鲜的蛋白酶抑制剂混合物），在冰上放置30 min，期间每10 min上下颠倒混匀一次。

注：植物样本不推荐使用匀浆法，液氮研磨法或冷冻研磨机法中液氮对破碎植物的细胞壁有非常好的效果。

5、超声处理

将裂解的蛋白样品放在冰上超声破碎，200W，2 min（开2s，关2s），充分打断核酸序列（用于Co-IP实验的样品不要对样品进行超声波处理）。

6、样品的使用与保存。

- 6.1 用于免疫沉淀、ELISA等非变性蛋白分析实验，4℃，10000 g离心5 min分离上清，取部分样品用来测浓度，剩下的蛋白样品可直接分成数管保存在-20℃或-80℃。
 - 6.2 用于免疫印迹的变性蛋白分析实验，取部分样品用来测浓度，剩下的蛋白样品按照3:1比例，混合蛋白样品和SDS-PAGE上样缓冲液。100℃沸水浴加热5 min，以充分变性蛋白。冷却至室温后，4℃，10000 g离心5 min分离上清，可直接上样到SDS-PAGE胶加样孔或分成数管保存在-20℃或-80℃。
- 注：用于免疫印迹的变性蛋白分析，在加入SDS-PAGE上样缓冲液煮样后再离心，可提高总蛋白的得率。**

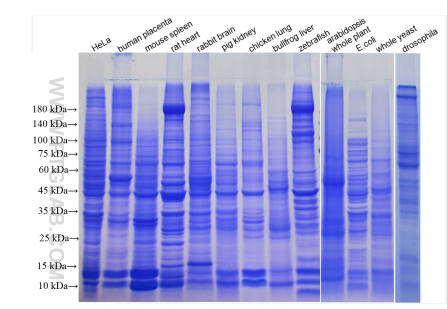
问题解答

问题	可能原因	解决方案
裂解不充分	裂解液加入量过少	加充足的裂解液
样品浓度低	裂解液加入量过多	减少加入的裂解液的使用量
样品粘度大	核酸未被打断成小片段	对样品进行超声波处理
有白色沉淀	细胞粘度高而结团	发现结团时迅速使用超声波将其打散
离心后沉淀多	裂解不充分	加大裂解液的使用量
未检测到阳性条带	目的蛋白属于低表达、易降解、磷酸化修饰、疏水性蛋白等特殊蛋白质	推荐选用其对应的专用提取试剂盒

注意事项

- 1、提取总蛋白样品的所有步骤都需在低温下进行。
- 2、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液中含少量DTT，有轻微刺激性气味，但不含剧毒的巯基乙醇。为取得最佳的使用效果，尽量避免过多的反复冻融，可以适当分装使用。
- 3、提取得到的总蛋白可以使用Proteintech的增强型BCA蛋白浓度检测试剂盒（PK10026）测定蛋白浓度，不适用Bradford法测蛋白浓度。
- 4、本试剂盒中试剂都应在室温下溶解，请勿加热。

Validation Data



SDS-PAGE胶 考马斯亮蓝染色图。胶浓度：8-18%梯度胶；上样量:30 ug。