

全能型蛋白抽提试剂盒

T615451

Component	20 mL	50 mL	100 mL	Storage
组分 A	40 μ L	100 μ L	200 μ L	-20°C
组分 B	20 mL	50 mL	100 mL	2-8°C

产品简介:

从细胞或组织中提取到完整的蛋白质样品是影响免疫印迹分析 (Western blotting, WB) 得到真实可靠结果的关键因素之一。在实际操作中, 从细胞膜、细胞质、细胞器及细胞核中提取蛋白质通常采用去污剂缓冲液 (如 RIPA 缓冲液) 和/或物理破碎 (如超声处理) 的方法; 尤其, 含有 0.1% SDS 的 RIPA 缓冲液或其替代品 (如不含 SDS 的 NP-40 缓冲液) 已作为一种标准方法被广泛用于哺乳动物细胞和组织的裂解。事实上, RIPA 可以有效溶解和提取分子量小于 90 kDa 的中、小分子的绝大部分的蛋白质, 但其对于分子量大于 90 kDa 的大分子蛋白质功效不大。为了更有效地提取到大分子蛋白, 许多实验室会将 RIPA 缓冲液和超声处理结合使用, 通过超声打断 DNA, 从而降低裂解液的粘稠度。然而, 超声处理会破坏大分子蛋白。此外, 为了保证蛋白质在提取的过程中不被细胞本身的蛋白酶降解和蛋白酶去修饰, 各种蛋白酶抑制剂和特异的酶抑制剂要加到 RIPA 缓冲液中。例如, 为了减少蛋白质的降解, 需要将蛋白酶抑制剂如 PMSF 添加到 RIPA 缓冲液中; 同样, 为了抑制磷酸酶活性, 需加入氟化钠和正钒酸钠。即便如此, 翻译后修饰的蛋白信号还是不能得到有效的保护。全能型蛋白抽提试剂盒解决了以上问题和缺陷。它可以快速完整的提取细胞和组织中蛋白质, 并有效保护蛋白质的化学修饰, 可以取代现有的 RIPA 及其衍生的缓冲液, 具有通用性好、应用广泛、实用高效等优点, 同时, 该抽提试剂盒在提取蛋白质时无需额外添加蛋白酶、磷酸酶以及其它酶抑制剂, 无需超声波处理, 不仅可以完整提取分子量大于 90kDa 的大分子蛋白质, 而且对小于 90kDa 的蛋白质分子应用同样有效, 大大简化了实验流程, 节约时间和材料成本, 从而在源头上为下游的蛋白质分析提供了优质完整的蛋白质样品。产品特性: 无需添加蛋白酶或其他酶抑制剂或超声处理; 只需混合试剂 A 和 B; 提取过程仅需 15 分钟; 接近完整地抽提大分子蛋白质; 无超声处理, 避免蛋白质片段化; 保护蛋白质翻译后修饰 (如磷酸化、糖基化、泛素化、甲基化和乙酰化) 无损失; 适用于哺乳动物细胞和组织的提取。

验证方法

免疫印迹分析

使用说明:

一、贴壁细胞实验方案

- 1、按 500 体积组方 B 加 1 体积组方 A (500:1) 充分混匀, 制备成组方 A+B 的工作裂解液置于冰上备用。注意: 根据步骤 3 提前计算您需要的裂解液的体积。
- 2、弃去细胞培养基, 用冰冷的 PBS 清洗细胞 2 次。
- 3、将培养皿/培养板置于冰或冰水中, 按 5×10^6 细胞添加 1 mL 裂解液 (例如, 将 300 μ L 裂解液加入到含有 1×10^6 细胞的 35 mm 培养皿中)。将培养皿/培养板在冰上再放置 5 分钟, 偶尔左右旋转以使裂解液完全覆盖细胞。
- 4、裂解 5 分钟后, 使用干净的塑料刮刀将细胞从培养皿/培养板上刮下, 并将裂解物收集到离心管中。
- 5、彻底涡旋混匀裂解物 (3 $\times$ 10 秒), 并将裂解物置于冰或冰水中再放置 10 分钟以完全裂解。
- 6、在 95 $^{\circ}$ C 加热裂解产物 5 分钟。
- 7、将裂解产物放在冰或冰水中冷却 3 分钟。
- 8、在 4 $^{\circ}$ C 以 13,000 g 离心裂解产物 5 分钟, 将提取的蛋白质的上清液转移到干净的离心管中。
- 9、使用分光光度计或 SDS 兼容的蛋白质浓度测定试剂盒测量蛋白质浓度。
- 10、将裂解产物分装并储存在 -20 $^{\circ}$ C 备用。注意: 如果免疫印迹分析采用还原 SDS-PAGE 胶, 必须向裂解物中添加终浓度为 2–5% 的 β -巯基乙醇或 50 mM DTT, 外加 0.1% 的溴酚蓝。上样前应将样品在 95 $^{\circ}$ C 下加热 5 分钟。

二、悬浮细胞实验方案

- 1、如贴壁细胞实验方案步骤 1 所述, 在使用前立即准备组方 A+B 工作裂解液。
- 2、将悬浮细胞以 300 g 离心 5 分钟, 弃去上清, 然后用 10 mL 冰冷的 PBS 重悬细胞。再次离心, 弃去 PBS, 用移液器将细胞重悬到残留的 PBS 中。
- 3、按 5×10^6 细胞加入 1 mL 裂解液, 通过移液器充分混匀, 然后置于冰或冰水中 5 分钟。
- 4、按照贴壁细胞实验方案中的步骤 5-10 进行操作。

三、组织蛋白抽提方案

- 1、如贴壁细胞实验方案步骤 1 所述, 在使用前立即准备组方 A+B 工作裂解液。
- 2、在液氮中, 使用研钵和杵将组织研磨成细颗粒。
- 3、按照 1 g 组织使用 3 mL 裂解液的比例, 将冷冻组织粉末加入裂解液中。
- 4、按照制造商的说明使用匀浆器对组织进行匀浆。(注: 匀浆会加热样品, 匀浆时务必始终将管子底部放在冰上或冰水中)。
- 5、在冰上孵育匀浆样品须 >15 分钟以达到完全裂解 (注: 如果实验同时有多个样品, 请将所有匀浆样品放在冰上, 直到完成最后 1 个样品)。

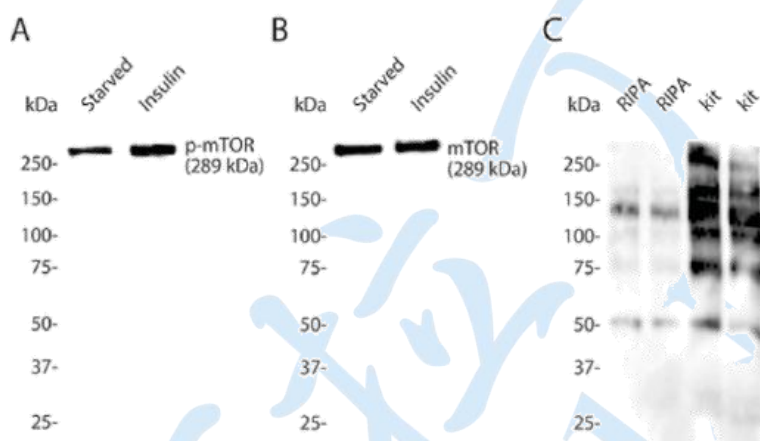
6、最后一个样品匀浆 15 分钟后，在 4℃ 下以 13,000 g 离心 10 分钟。将提取的蛋白质的上清液转移到干净的离心管中。

7、按照贴壁细胞实验方案中的步骤 6-10 进行操作。

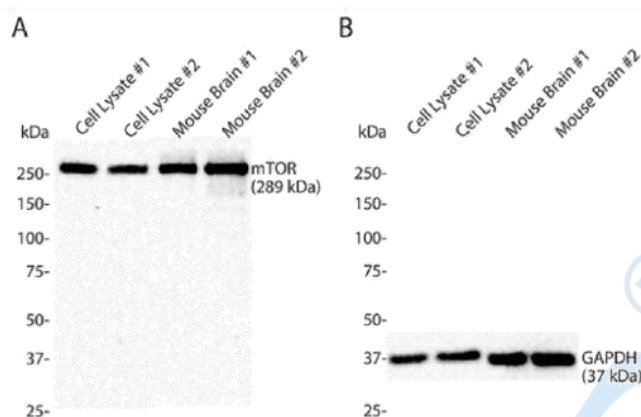
注意事项：

若试剂 B 在 4℃ 下长时间保存，可能会出现沉淀，这不会影响产品质量。当移至室温下，沉淀会重新溶解。

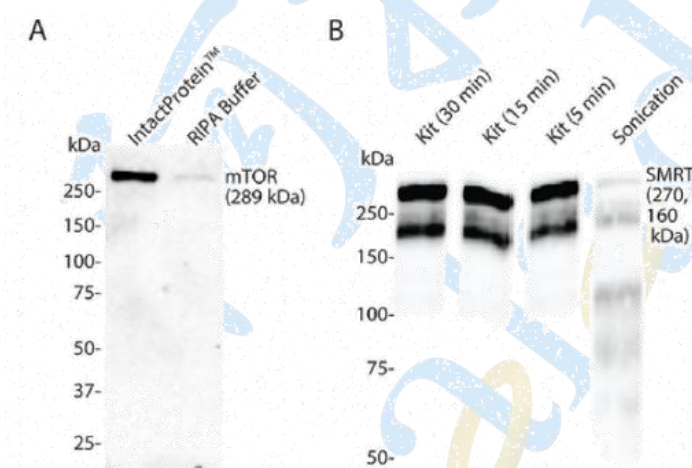
验证数据



Universal Protein Extraction Sample Kit effectively preserves protein post-translational modifications. (A-B) HeLa cells were serum starved for 16 h and stimulated with insulin (150 nM) for 5 min before protein extraction using the Total Protein Extraction Sample Kit. Total lysates (50 ug) were immunoblotted with anti phospho-mTOR (Ser2448) (A) and anti-mTOR (B) antibodies, respectively. (C) HeLa cells were lysed using the RIPA buffer or the Total Protein Extraction Sample Kit. Cell lysates were immunoblotted with anti-O-GlcNAc (glycosylation) antibody.



The Total Protein Extraction Sample Kit is effective in extracting proteins from tissues and cells. (A) HeLa cells and mouse brains (in duplicate) were lysed using the Total Protein Extraction Sample Kit. Total lysates (50 ug) were immunoblotted with anti-mTOR antibody. (B) The same lysates in (A) were immunoblotted with anti-GAPDH antibody. Note that the Total Protein Extraction Sample Kit is suitable for extracting proteins with a broad molecular weight range from both cells and tissues.



The Total Protein Extraction Sample Kit demonstrates superior performance in extracting large proteins. (A) HeLa cells were lysed using the Total Protein Extraction Sample Kit or RIPA buffer. Total lysates (50 ug) were immunoblotted with anti-mTOR antibody. (B) HT1080 cells were lysed using the Kit, processed for the indicated period, and immunoblotted with anti-SMRT antibody. Note that sonication fragmented SMRT to smaller peptides.