

# Minute™ 动物脂肪组织及细胞总蛋白提取试剂盒

目录号：AT-022

## 描述：

脂肪组织特别是白色脂肪组织（WAT）已经被证实除了具有能量储存功能外，还与内分泌和器官炎症有关。从脂肪组织中提取和分析蛋白质对于了解许多生理/病理状态越来越重要。但是由于白色脂肪组织（WAT）和棕色脂肪组织（BAT）中高脂肪和低蛋白含量，所以在技术上极具挑战性。众所周知目前生物样品中水油乳化物最难分离，我们研发的具有独特表面性质的带孔径的离心管柱和优化的无表面活性剂的缓冲液系统，可以快速有效的从脂肪组织匀浆中将水油乳化物分离。提取缓冲液比脂肪组织中的油冰点低，脂肪组织匀浆通过离心管柱能将水相和油相迅速分开，组织中的总蛋白无丢失。蛋白质得率可达 2-3 mg/ml，远远高于其他方法。

## 应用：

可应用于 2-D，ELISA，SDS-PAGE，immunoblottings，IP，酶活性检测及其他应用。

## 试剂盒组分(20T)：

1. 15ml 缓冲液 A（提取缓冲液）
2. 1.5ml 缓冲液 B（10X 变性缓冲液）
3. 1.5ml 缓冲液 C（10X 非变性缓冲液）
4. 20 个 1.5ml 离心管
5. 2 根 1.5ml 研磨棒
6. 20 套离心管柱及接收管
7. 蛋白提取粉（2g）

## 储存及运输

Buffer A 储存于 4°C，其余部分室温储存。常温运输。

## 所需附加材料

台式离心机

## 重要产品信息

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需保存较长时间，建议在缓冲液A中添加蛋白酶抑制剂。研究蛋白磷酸化，磷酸酶抑制剂务必在使用前加入缓冲液A中。（各类抑制剂的添加方法请按照抑制剂母液比例，例如母液是100x，添加时按照1:100添加，即1ml缓冲液中添加10ul抑制剂）。推荐使用BCA试剂盒用于蛋白浓度测定。

**注意：如果发现缓冲液 B 在低温出现沉淀，可以将其放置到高于 37 度的环境直至沉淀复溶。**

## 操作步骤：

### 从脂肪组织中提取蛋白（白色脂肪组织或棕色脂肪组织）

1. 将缓冲液 A，离心管柱和接收管套管放置于冰上预冷。
2. 称取 50-80mg 新鲜或冷冻脂肪组织，把它放在几层纸巾上，用拇指和食指挤压，从组织中去除一部分油。用镊子将组织放入试剂盒提供的 1.5ml 离心管中（**注意：此处离心管必须使用试剂盒配备 1.5ml 离心管**），称取 80-100mg 蛋白提取粉加入样品中。加入 50ul 缓冲液 A。
3. 用研磨棒向下按压并反复扭转研磨组织样品 1-2 分钟成浆状。再加入 200-300ul 缓冲液 A，继续研磨样品 30 秒钟。（研磨棒可以重复使用，用酒精擦拭清洁，空气干燥即可）。如果起始组织量较小（20-40mg）需要加入 100-150ul 缓冲液 A。

**注：可根据需要将缓冲液 A 增加到 500  $\mu$ l 更易研磨，但可能会降低最终蛋白浓度。**

4. 盖上盖子，350Xg 离心 1 分钟。将上清液转移到放置在接收管里的离心管柱中（转移过程中有部分脂肪聚集物一起被转移也没有关系）。
5. 在-20°C，**开盖孵育** 15-20 分钟。（请确保冰箱温度在-20°C附近，确认方法参照下方技术要点）
6. 孵育后立刻 350Xg，**开盖**离心 1-2 分钟。**注：如果发现离心柱中仍然存在缓冲液，离心力可增加到 600Xg，离心 2 分钟。**弃去离心管柱，所得为脂肪组织中的总蛋白。由于含有少量非水溶

性细胞组分，所以提取液看起来可能有些浑浊为正常现象。可以将其稀释后直接用于 ELISA 检测水溶性蛋白。也可以用缓冲液 B 或 C 重悬溶解非水溶性组分后用于不同的下游应用：

A.在提取出的蛋白溶液中加入 1/10 体积的缓冲液 B 成为变性蛋白溶液(用于 SDS-PAGE, Western 和其他应用)

B.在提取出的蛋白溶液中加入 1/10 体积的缓冲液 C 成为非变性蛋白溶液（用于 IP, ELISA 和其他应用)

C.用 2x 的 2D 胶样品缓冲液溶解用于 2D 分析。

**注意：缓冲液 A 中含有可能会干扰质谱分析的成分。如果提取的蛋白用于质谱分析，在提取后需透析缓冲液，或者用 TCA 法沉淀蛋白。**

## 从脂肪细胞中提取蛋白

1. 在 1.5ml 离心管中低速离心(1,000 X g 5 分钟)收集 30-50 x10<sup>6</sup> 脂肪细胞，加入 PBS 清洗细胞一次。如果离心后脂肪细胞浮在液体上，用注射器取出培养基或 PBS。
2. 加入 80mg 蛋白提取粉，用提供的研磨棒扭转研磨 1-2 分钟，加入 200-300ul 缓冲液 A（可根据上述建议加入磷酸酶抑制剂和/或蛋白酶抑制剂），继续研磨 30 秒。
3. 350Xg 离心 1 分钟，然后将上清液转移到预冷的离心管柱接收管套管中。接转上面组织样品提取的 5-6 步骤。

## 技术要点：

- 1 BCA 检测蛋白浓度时，我们推荐使用 PBS 缓冲液进行标准曲线稀释。提取的蛋白样品和 Buffer A 分别使用 PBS 按照 1: 4 进行稀释，使用稀释后的 Buffer A 作为阴性对照（即曲线的零坐标点），稀释后的蛋白样品直接进行浓度测定即可。**

2 操作步骤非常简单和直接，但是步骤 5 中的孵育时间是从组织中将水相和油相完全分离的关键。由于实验室的冰箱实际温度会有变化，我们建议做如下简单的测试来决定孵育时间：在 1.5ml 离心管中加入 0.5ml 水，在冰箱里开盖孵育，使水完全冷冻的最少时间作为第 5 步骤的建议孵育时间。也可以在-70 到-80°C进行冷冻测试，这样可以减少第 5 步的孵育时间。

更多信息和活动请扫描  
二维码关注官方公众号

