

# Minute<sup>TM</sup> 总蛋白提取试剂盒 (脂肪细胞和组织)

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, 我公司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

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：

Buffer A 储存于 4°C, 其余部分室温储存

## 所需附加材料

台式离心机（最大转速 14000-16000rpm）

## 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保存较长时间，建议在缓冲液 A 中添加蛋白酶抑制剂。推荐使用 BCA（Pierce）试剂盒用于蛋白浓度测定。研究蛋白磷酸化，磷酸酶抑制剂应在使用前加入缓冲液 A 中。

## 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，称取 100mg 蛋白提取粉加入样品中。加入 50ul 缓冲液 A。
- 3.用研磨棒扭转研磨组织样品 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。如果起始组织量较小（20-40mg）需要加入 100-150ul 缓冲液 A。
- 4.盖上盖子，2000rpm 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（研磨棒可以重复使用，用酒精擦拭清洁，空气干燥）。
- 5.在-20℃，开盖孵育 15-20 分钟。（请确保冰箱温度在-20℃附近，否则参照下面的常见问题）
- 6.孵育后立刻在 2000rpm，开盖离心 1-2 分钟。弃去离心管柱，所得为脂肪组织中的总蛋白。提取出的蛋白中含有少量不溶物为非水溶性细胞组分。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 重悬溶解非水溶性蛋白用于下游应用：

A.在提取出的蛋白溶液中加入 1/10 缓冲液 B 成为变性蛋白溶液（用于 SDS-PAGE，Western 和

其他应用) 或者

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

或者

C.用 2X 的 2D 胶样品缓冲液溶解用于 2D 分析。

**注意：缓冲液 A 中含有可能会感染质谱分析的组分。如果提取的蛋白用于质谱分析，在提取前需透析缓冲液，或者用 TCA 法沉淀蛋白。**

## 从脂肪细胞中提取蛋白

1. 低速离心收集 50-100million 脂肪细胞。在 1.5ml 离心管中加入 1ml 预冷的 PBS (可根据上述建议加入磷酸酶抑制剂或者蛋白酶抑制剂) 重悬细胞。加入 100mg 蛋白提取粉
2. 3000rpm 离心 3 分钟, 弃去上清液。用研磨棒扭转研磨 1-2 分钟使细胞匀浆。加入 200-300ul 缓冲液 A, 继续研磨 30 秒。
3. 2000rpm 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。接转以上步骤 5-6

### 常见问题：

**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，我们建议做一个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℃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

