

MinuteTM 质谱总蛋白提取试剂盒

目录号：MS-026

描述：

质谱分析已经成为蛋白质分析和鉴定的常用方法。传统的总蛋白提取方法，例如 RIPA 缓冲液蛋白提取存在着提取蛋白不完整的问题，并且 RIPA buffer 中的某些成分不能兼容下游应用实验。我们开发的 MinuteTM 质谱总蛋白提取试剂盒可以克服这些问题，该试剂盒可以快速高效从动物细胞或组织中提取完整的总蛋白，无偏差。提取的蛋白质兼容胰酶消化，iTRAQ 标记和生物素标记。由于使用离心管柱技术提取，提取量小可低至 20ul，最大可达 500ul。这个特有的特性可以有效解决起始材料不足的问题。总蛋白可以被快速提取，产量高达 2-8mg/ml。

应用：

该试剂盒能有效的提取总蛋白，可应用于胰酶消化后的质谱分析，iTRAQ，生物素标记和其他应用。

试剂盒组分(50T)：

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

运输与储存：

常温运输，室温储存。

重要产品信息

试剂盒可快速提取总蛋白，蛋白酶抑制剂可选择性加入，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。研究蛋白磷酸化，磷酸酶抑制剂应在使用前加入裂解缓冲液。

(请按照蛋白酶或磷酸酶抑制剂母液比例，例如母液是100x，添加时按照1：100添加，1ml缓冲液A添加10ul)

抑制剂)。推荐使用BCA法测定蛋白浓度。

所需附加材料

1XPBS

涡旋震荡仪

台式离心机

BCA 蛋白定量试剂盒

冷丙酮

操作方法：

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，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。
- 4.将裂解的细胞转移到预冷的离心管柱套管中，14,000-16,000 Xg 离心 30 秒。
- 5.立刻将收集管放置于冰上，弃去离心管柱。
- 6.加入 6X 的冷丙酮（1 倍体积蛋白溶液+6 倍体积丙酮，储存于-20℃）。混匀，在-20℃孵育至少 1 小时到过夜（蛋白浓度 < 1mg/ml 时推荐过夜孵育）。
- 7.孵育后，台式离心机 14,000-16,000Xg，4℃，离心 10-15 分钟。弃掉上清液，让其在空气中干燥。沉淀即为提取的总蛋白。可根据下游实验用不同的缓冲液溶解沉淀。（见下方）

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 1×10^6 个细胞

B. 贴壁细胞

- 1.将离心管柱及接收管套管放在冰上预冷
- 2.将贴壁细胞培养至 90-100%融合，将预冷的 PBS 直接加入培养板，培养皿或培养瓶中清洗一次细胞，完全弃去上清。
- 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，旋转使裂解液分布在培养物的整个表面。用移液器或移液管刮取溶解的细胞，并将细胞溶解液转移到预冷的离心管柱套管中，14,000-16,000Xg 离心 30 秒取出。弃掉离心管柱，将收集管置于冰上。
- 4.加入 6X 的冷丙酮（1 倍体积蛋白溶液+6 倍体积丙酮，储存于-20 °C）。混匀，在-20°C 孵育至少 1 小时到过夜（蛋白浓度 < 1mg/ml 时推荐过夜孵育）。
- 5.孵育后，台式离心机 14,000-16,000Xg，4°C 离心 10-15 分钟。弃掉上清液，让其在空气中干燥。沉淀即为提取的总蛋白。可根据下游实验用不同的缓冲液溶解沉淀。（见下方）

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 cm ² 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 动物组织中提取，如果起始量较大或者较小，需按比例调整相应裂解液的用量。

- 1.将离心管柱及接收管套管放在冰上预冷。
- 2.将 15-20mg 新鲜或冷冻组织放置于离心管柱套管上，用塑料研磨棒扭转研磨 50-60 次，加入 200ul 细胞裂解液，继续研磨 30-60 次。注意：塑料研磨棒可以重复使用，用蒸馏水彻底冲洗干净，用纸巾擦干即可。
- 3.室温开盖孵育 2-3 分钟，14,000-16,000Xg 离心 1 分钟取出。弃掉离心管柱，将收集管置于冰上。
- 4.加入 6X 的冷丙酮（1 倍体积蛋白溶液+6 倍体积丙酮，储存于-20 °C）。混匀，在-20°C 孵育至少 1 小时到过夜（蛋白浓度 < 1mg/ml 时推荐过夜孵育）。

5.孵育后，台式离心机 14,000-16,000 Xg, 4°C, 离心 10-15 分钟。弃掉上清液，让其在空气中干燥。沉淀即为提取的总蛋白。可根据下游实验用不同的缓冲液溶解沉淀。(见下方)

丙酮沉淀的蛋白质可以根据不同的下游实验溶解于不同的缓冲液。

以下是一些例子：

A . 胰酶消化：用含有 0.1%SDS 的 50mM 碳酸氢钠溶液 (PH 8.0) 重悬沉淀。检测蛋白浓度和稀释蛋白可以用 50mM 碳酸氢钠。在大多数情况下，使用该试剂盒提取的蛋白质浓度足以直接进行胰蛋白酶消化，无需丙酮沉淀。提取物可用 50 mM 碳酸氢钠稀释 5-10 倍。稀释后，通过 BCA 分析检查蛋白质浓度，并取所需量进行胰蛋白酶消化。

B . iTRAQ 标记：用含有 6M 尿素的 50mM 三乙基碳酸氢铵 (TEAB) 重悬沉淀。稀释蛋白溶液时使用 50mM 三乙基碳酸氢铵，使得胰酶消化前尿素浓度低于 1M。

C . 生物素标记：用 0.1%吐温-20，50mM 碳酸氢钠，2%十二烷基麦芽糖苷 (pH 8-8.5) 溶液重悬沉淀。

更多信息和活动请扫描
二维码关注官方公众号

