

Minute™ 动物细胞/组织总蛋白提取试剂盒

目录号:SD-001/SN-002

描述：

Minute™ 动物细胞/组织总蛋白提取试剂盒，是新一代超快速蛋白质提取工具，提取的总蛋白不改变蛋白图谱无丢失。越来越多的证据表明最常用的 RIPA 缓冲液可能引起不可预测的蛋白质丢失，产生很多难以解释的疑难数据。离心管柱提取技术可有效解决蛋白丢失问题。离心管柱技术结合优化的裂解缓冲液可以更有效地提取总蛋白。使用离心管柱技术提取蛋白，提取体系最低可以低至 20μl——有效解决样品量受限的样本。试剂盒同时提供天然和变性两种不同的裂解液，可供根据下游应用需求选择。离心管柱技术从细胞/组织中提取总蛋白仅需 1-8 分钟，平均得率可达 2-8mg/ml。

RIPA buffer 关于蛋白质丢失的参考文献：

1. Bai,B., and Laiho, M. (2012) Proteomics. 12:3044-3048
2. Mukhopadhyay, C. et al. (2016) PNAS 5:8228-8237
3. Li, Q. (2016) Biotechniques. 61:327
4. Ngoka, L. CM. (2008) Proteome Science. 6:30

应用：

可应用于 SDS-PAGE, immunoblottings, IP, ELISA, 酶检测及其他应用。这个试剂盒提供了更快的总蛋白提取方法。提取的蛋白可以用于小型色谱纯化柱纯化蛋白的原料使用。

试剂盒组分

50T:

1. 25ml 变性细胞裂解液 (SD-001)
2. 25ml 天然细胞裂解液 (SN-002)
3. 50 个离心管柱
4. 50 个收集管
5. 2 根塑料研磨棒

4T:

1. 2.0ml 变性细胞裂解液 (SD-001)
2. 2.0ml 天然细胞裂解液 (SN-002)
3. 4 个离心管柱
4. 4 个收集管
5. 1 根塑料研磨棒

****注:试剂盒中的细胞裂解液不含任何还原剂和伯胺。**

运输储存： 常温运输，室温保存。

重要产品信息

1. **Minute™ 总蛋白提取试剂盒**是一款快速总蛋白提取试剂盒。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，建议添加蛋白酶抑制剂。研究蛋白磷酸化，磷酸酶抑制剂（例如 罗氏的磷酸酶抑制剂）应在使用前加入裂解缓冲液。（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。
2. 裂解液的选择要根据下游实验来决定，变性裂解液（SD-001）适合用于 SDS-PAGE，WB 实验，天然裂解液（SN-002）适合用于 ELISA，IP，CO-IP 等实验。
3. 使用 SD-001 变性裂解液提取的蛋白和使用 SN-002 天然裂解液提取的蛋白，做 WB 上样前，仍需和 loading buffer 混匀煮制样品。
4. 如果发现变性裂解液低温下出现沉淀，在大于 37 度温度下孵育至沉淀复溶。

所需附加材料

1 X PBS

涡旋震荡仪

台式离心机

BCA 蛋白定量试剂盒

操作方法：

细胞样品总蛋白提取

变性总蛋白提取（SD-001） SDS-PAGE，WB 实验适用

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，在离心管中加入预冷的 PBS，500Xg 离心 2-3 分钟清洗细胞。弃去上清，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（SD-001），涡旋震荡裂解细胞。（**细胞数量和裂解液须保证对应关系，以达到最佳提取效率**）

请注意：部分未完全裂解的细胞不会影响样品质量。

- 4.将细胞裂解物转移到预冷的离心管柱套管中，14,000-16,000Xg 离心 30 秒取出。
- 5.立刻将收集管放置于冰上，弃去离心管柱，蛋白提取完成可应用于下游实验。

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 1X10⁶ 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.培养贴壁细胞至 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，完全弃去上清。
- 3.按照表 2 中将相应体积的细胞裂解液 (SD-001) 均匀的加入整个器皿表面，用移液器吹打几次，将裂解的细胞转移到预冷的离心管柱套管中，14,000-16,000Xg 离心 30 秒取出。**(如提取浓度不佳，可减少裂解液使用量)**
- 4.立刻将收集管放置于冰上，弃去离心管柱，蛋白提取完成可应用于下游实验。

表格 2，不同贴壁细胞量应加入相应体积裂解液 (裂解液用量仅供参考，可根据细胞数量增加或减少)

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

天然总蛋白提取 (SN-002) ELISA, IP, CO-IP, 酶活性检测等实验适用

A . 非贴壁细胞

- 1.将天然细胞裂解液 (SN-002)，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，在离心管中加入预冷的 PBS,500Xg 离心 2-3 分钟清洗细胞。弃去上清，在管中保留与细胞体积相同体积的 PBS。旋窝震荡重悬细胞。
- 3.加入表格 3 中相应体积的细胞裂解液，涡旋震荡裂解细胞 15 秒。将离心管放置于冰上 3-5 分钟然后涡旋震

荡 10 秒。**(细胞数量和裂解液须保证对应关系，以达到最佳提取效率)**

4. 将细胞裂解物转移到预冷的离心管柱套管中，14,000-16,000Xg 离心 30 秒取出。
5. 立刻将收集管放置于冰上，弃去离心管柱，蛋白提取完成可应用于下游实验。

表格 3，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 1X10⁶ 个细胞

B 贴壁细胞

1. 将天然细胞裂解液 (SN-002)，离心管柱及接收管套管放在冰上预冷。
2. 培养贴壁细胞至 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贴壁细胞两次，完全弃去上清。
3. 按照表 4 中将相应体积的细胞裂解液均匀的加入整个器皿表面，放置于冰上孵育 5 分钟，用移液器吹打几次，将细胞裂解物转移到预冷的离心管柱套管中，14,000-16,000Xg 离心 30 秒取出。**(如提取浓度不佳，可减少裂解液使用量)**
4. 立刻将收集管放置于冰上，弃去离心管柱，蛋白提取完成可应用于下游实验。

表格 4，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	250
25 cm ² 培养瓶	1.5-2 Million	500

动物组织总蛋白提取

变性总蛋白提取 (SD-001) **SDS-PAGE, WB 实验适用**

以下步骤是从 15-20mg 组织中提取，**如果起始量较大或者较小，需调整相应裂解液的用量比例。**

- 1.将离心管柱及接收管套管放在冰上预冷。
- 2.将 15-20mg 新鲜/冷冻组织放置于离心管柱套管上,用塑料研磨棒向下按压反复扭转研磨 50-60 次,加入 200ul 变性细胞裂解液 (SD-001),继续研磨 30-60 次。**(组织用量不要过量,无需过度研磨,裂解液可分两次加入以得到最佳效果)** 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。
- 3.盖上盖子室温孵育 1-2 分钟, 14,000-16,000Xg 离心 1-2 分钟,弃去离心管柱,收集管里即是抽提的变性总蛋白。

请注意:部分未完全裂解的组织不会影响样品质量。

天然总蛋白提取 (SN-002) ELISA, IP, CO-IP, 酶活性检测等实验适用

- 1.将天然细胞裂解液 (SN-002),离心管柱及接收管套管放在冰上预冷。
- 2.将 15-20mg 新鲜/冷冻组织放置于离心管柱上,用塑料研磨棒向下按压反复扭转研磨 50-60 次,加入 200ul 天然细胞裂解液 (SN-002),继续研磨 30-60 次。**(组织用量不要过量,无需过度研磨,裂解液可分两次加入以得到最佳效果)**。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。
- 3.开盖冰上孵育 5 分钟,盖上盖子,4°C,14,000-16,000Xg 离心 1-2 分钟,弃去离心管柱,收集管里即是抽提的天然总蛋白。

常见问题

问题	解决方案
裂解物太粘稠,无法用 200-1000 μ L 吸头吹打	将细胞裂解物倒入离心管柱中或将吸头剪掉尖端
离心 30 秒后离心管中还存留细胞裂解液	减少起始细胞/组织的数量或增加细胞裂解液
低蛋白浓度	增加起始细胞/组织的数量或减少细胞裂解液量
高分子量范围 (100-300KDa) 蛋白条带弱	增加细胞裂解液量,确保细胞/组织裂解充分

更多信息和活动请扫描
二维码关注官方公众号

