

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，与传统的溶液提取法相比，提取的总蛋白无丢失，不改变蛋白图谱。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这一问题。离心管柱技术结合优化高效的裂解缓冲液可以更简单有效地提取总蛋白。使用离心管柱技术提取蛋白，提取体系最低可以低至 20 μ l——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，可满足不同下游应用的需求。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。

关于使用 RIPA buffer 导致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, 免疫印迹, 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

50 Preps:

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

4 Preps:

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需要保存较长时间，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液中。（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 裂解液中添加 10ul 抑制剂）。推荐使用 **BCA 试剂盒**用于蛋白浓度测定。
2. 裂解液的使用要根据下游实验来选择，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,仍需加 Loading buffer 混匀煮沸样品后上样。
4. 如果变性裂解液在低温情况下出现沉淀，在 37 度以上孵育至沉淀复溶可正常使用。

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（filter cartridges）套入接收管中，成为套管放置于冰上预冷。
- 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，盖上盖子，14,000-16,000Xg 离心 30 秒取出。

5. 弃去离心管柱，收集管中即是蛋白样品，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（裂解液用量仅供参考，可根据细胞数量增加或减少）

细胞体积 (ul)	裂解液 (ul)	相当细胞量# X 10 ⁷
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 1X10⁷ 个细胞

B . 贴壁细胞

1. 将离心管柱（filter cartridges）套入接收管中，成为套管放置于冰上预冷。
2. 贴壁细胞生长至 90-100%融合时，将预冷的 PBS 直接加入培养板，培养皿或培养瓶中清洗一次，完全吸出上清。
- 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，用移液器反复吹打几次以裂解细胞，将细胞裂解物迅速转移到预冷的离心管柱套管中，盖上盖子，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. 弃去离心管柱，收集管中即是蛋白样品，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. 将离心管柱（filter cartridges）套入接收管中成为套管，与天然细胞裂解液（SN-002）共同放置于冰上预冷。
2. 低速离心收集细胞，在离心管中加入预冷的 PBS 清洗细胞一次，500Xg 离心 2-3 分钟沉淀细胞。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，盖上盖子，14,000-16,000Xg 离心 30 秒取出。
5. 弃去离心管柱，收集管中即是蛋白样品，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（裂解液用量仅供参考，可根据细胞数量增加或减少）

细胞体积 (ul)	裂解液 (ul)	相当细胞量# X 10 ⁷
3	25	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 1X10⁷ 个细胞

B. 贴壁细胞

1. 将离心管柱 (filter cartridges) 套入接收管中成为套管，与天然细胞裂解液 (SN-002) 共同放置于冰上预冷。
2. 贴壁细胞生长至 90-100%融合时，用预冷的 PBS 清洗细胞两次，完全吸出上清。
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，用移液器反复吹打以裂解细胞，将细胞裂解物转移到预冷的离心管柱套管中，盖上盖子，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. 弃去离心管柱，收集管中即是蛋白样品，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（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	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 动物组织中提取，**对于不同的样品起始量，需按比例调整裂解液的用量。**

1. 将离心管柱 (filter cartridges) 套入接收管中，成为套管放置于冰上预冷。
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。

4. 弃去离心管柱, 收集管中即是蛋白样品, 可应用于下游实验。

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. 将离心管柱 (filter cartridges) 套入接收管中成为套管, 与天然细胞裂解液 (SN-002) 共同放置于冰上预冷。

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。

4. 弃去离心管柱, 收集管中即是蛋白样品, 可应用于下游实验

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 秒后离心柱上还存留细胞裂解物	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

