

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，例如基于 RIPA 的裂解液，蛋白提取存在非系统性蛋白损失，可能会改变内源性基线。并且 RIPA buffer 中的某些成分与质谱和其他下游应用不兼容。MinuteTM 质谱总蛋白提取试剂盒使用特制配方的裂解液和离心管柱技术快速提取总蛋白。提取的蛋白质兼容胰酶消化，随后可进行质谱分析，iTRAQ 标记和生物素标记等。由于使用离心管柱技术，提取体积小可低至 20ul，可以有效解决起始材料不足的问题。一般平均产量可达 2-8mg/ml。

试剂盒组分(50 Preps):

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

试剂盒用于可快速提取总蛋白进行质谱分析，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，建议在裂解液中添加蛋白酶抑制剂。研究蛋白质磷酸化，磷酸酶抑制剂应在使用前加入裂解液中。（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裂解液中添加10ul抑制剂）。

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 (filter cartridge) 插入接收管中形成套管，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，在管中留下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/倒入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. 加入冷丙酮 (1 倍体积蛋白溶液+6 倍体积储存于-20℃的丙酮)。混匀，在-20℃孵育 1-12 小时 (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。(参见下文技术说明)

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 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 cartridge) 插入接收管中形成套管，放在冰上预冷。
2. 将贴壁细胞培养至大于 90%融合，用预冷的 PBS 清洗一次细胞，完全弃去上清。
3. 按照表格 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。用移液器或细胞刮刀刮取裂解的细胞，并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。弃掉离心管柱，将收集管置于冰上。
4. 加入冷丙酮 (1 倍体积蛋白溶液+6 倍体积储存于-20℃的丙酮)。混匀，在-20℃孵育 1-12 小时 (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℃ 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。（参见下文技术说明）

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

以下步骤适用于从 15-20mg 动物组织中提取，裂解液的用量可根据试剂组织量按比例调节。

1. 将离心管柱（filter cartridge）插入接收管中形成套管，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，用塑料研磨棒向下按压扭转研磨 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. 加入冷丙酮（1 倍体积蛋白溶液+6 倍体积储存于-20℃的丙酮）。混匀，在-20℃孵育 1-12 小时（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℃，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。（参见下文技术说明）

技术说明：

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。测定蛋白浓度，并用 50 mM 碳酸氢钠将蛋白稀释（5-10 倍）至所需浓度。在大多数情况下，使用本试剂盒提取的蛋白质浓度足以直接进行胰蛋白酶消化。通过 BCA 测定蛋白质浓度，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

