

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基于离心管柱技术的蛋白提取系统,旨在从动物培养细胞和组织中快速高效地提取总蛋白。与传统的基于溶液的方法不同(例如 RIPA 缓冲液,通常会导致蛋白质丢失和蛋白图谱改变),离心管柱技术能够保持蛋白质的完整性并能获得可重复的结果。

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,只需 1-5 分钟即可获取 1-8 mg/ml 的蛋白质。试剂盒同时提供变性和天然两种不同的裂解液,用户可根据下游应用进行选择,满足不同实验需求。

提取体系最低可以低至 20µl,是起始材料有限时的理想选择。

应用:

Minute™总蛋白提取试剂盒能够快速高效地从无脊椎动物和脊椎动物培养细胞及组织中分离总蛋白。可应用于 SDS-PAGE、Western blotting、免疫沉淀 (IP)、ELISA 和酶活性测定等下游应用。该试剂盒提供了更快的总蛋白制备方案,并且可以轻松适用于高通量工作流程。提取的蛋白质也适合作为柱层析小规模纯化的起始材料。

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，以防止蛋白降解。研究蛋白磷酸化，磷酸酶抑制剂应在使用前加入裂解液中，以保持蛋白磷酸化状态。（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，酶活性检测等实验。
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即可正常使用。

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

- 1.将离心管柱（filter cartridges）放入收集管中形成离心管柱套管，并将其置于冰上预冷。
- 2.通过低速离心收取细胞，在 1.5 ml 微量离心管中用预冷的 PBS 洗涤细胞沉淀一次。
- 3.以 500-600X g 离心 3 分钟沉淀细胞，弃去上清液。
- 4.向细胞沉淀中加入 20-500 μ l 裂解液（SD-001 或 SN-002）。涡旋 10-20 秒以完全裂解细胞（也可使用移液器吹打）。推荐使用的裂解液量与细胞比例，请参见下方表 1-4。
- 5.将混匀的裂解物转移至离心管柱套管中。使用台式离心机在 14,000-16,000X g 下离心 30 秒。

6.弃去离心管柱，收集管中的液体即是提取的总蛋白，可用于下游应用。

从培养细胞中提取蛋白质的建议（裂解液用量仅供参考，可根据细胞数量增加或减少）

- 使用变性裂解缓冲液（SD-001）提取总蛋白

A.悬浮细胞

以 500-600 X g 离心 3 分钟收取细胞。用预冷的 1X PBS 清洗细胞，并估算细胞湿体积。

表 1.针对不同细胞体积推荐的裂解缓冲液体积 *

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

B.贴壁细胞

用预冷的 1 X PBS 清洗细胞后，加入适当的裂解液并通过上下移液吹打 10-20 次裂解培养容器中的细胞。

表 2.不同贴壁细胞数的裂解缓冲液推荐用量*

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

-使用天然裂解缓冲液（SN-002）提取总蛋白

A.悬浮细胞

以 500-600 X g 离心 3 分钟收取细胞。用预冷的 1X PBS 清洗细胞，并估算细胞湿体积。

表 3.不同细胞体积加入裂解液体积表*

细胞体积 (ul)	裂解液 (ul)	相当细胞量# × 10 ⁶
3	25	0.3
5	50	0.5
10	100	1
20	200	2

B.贴壁细胞

用预冷的 1 X PBS 清洗细胞，加入适当的裂解液在培养容器中通过上下移液吹打 10-20 次裂解细胞。

表 4.不同贴壁细胞量加入裂解液体积表*

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

1. 将离心管柱 (filter cartridges) 放入收集管中形成离心管柱套管，并将其置于冰上预冷。
2. 将 1-20 mg 新鲜或冷冻组织置于收集管中的离心管柱中。使用塑料棒以扭转运动研磨组织 20-30 次。将 50-200 μl 裂解缓冲液 (SD-001 或 SN-002) 直接加入离心管柱中 (**对于不同的样品起始量，需按比例调整裂解液的用量。建议按照样品重量与裂解液 1: 10 添加**)。继续研磨 10-20 次直至使组织均质化。

注：塑料棒可重复使用。用蒸馏水彻底冲洗，然后用干净的纸巾擦干。

3. 盖上盖子，使用台式离心机以最大速度 (14,000-16,000 X g) 离心 30 秒至 1 分钟。
4. 弃取离心管柱，收集管中的液体是提取的总蛋白，可用于下游应用。

高通量提取总蛋白

离心管柱与裂解缓冲液（SD-001 或 SN-002）配合使用，非常适合高通量应用，能够同时从多种动物组织样本或培养细胞中快速、一致地提取总蛋白。为了在高通量工作流程中获得最佳性能，需要配备可容纳多个 2 mL Eppendorf 管配件的样品混合器或涡旋器，最低转速为 2,500 rpm。

- 1.将 5-30 mg 新鲜或冷冻组织放入已安装于收集管中的离心管柱中。
- 2.在每个离心管柱中加入 100-300 μ l 裂解缓冲液（SD-001 或 SN-002）。盖紧盖子并将其放入多通道采样适配器中。
- 3.室温下 2,000-2,500 rpm 涡旋 3-5 分钟
- 4.涡旋结束后，将所有样品连同混合装置一起转移到兼容的转子适配器（例如 96 孔板适配器）中，并以最大转速离心 1-2 分钟。或者取出离心管柱套管，放入台式离心机中以最大转速离心 30 秒至 1 分钟。
- 5.收集管中的液体即为总蛋白，可用于下游应用。蛋白产量通常在 1-5 mg/ml 之间。

注意：

- a). 对于培养细胞样品，请参阅表 1-4 了解缓冲液体积和处理方法。涡旋（步骤 3）通常可以省略。
- b). 虽然提高涡旋速度和持续时间可以提高蛋白产量，但请勿超过 28,000rpm 或涡旋时间超过 10 分钟，因为这可能会损害蛋白的完整性。

技术说明：

- 1.本实验可在室温下进行。
2. 只要离心后没有堵塞离心管柱，说明可以容纳比推荐量更多的起始材料。组织样本起始量推荐范围为 1-20mg/次，建议不超过 30mg/次。
- 3.细胞样品收取后可用 0.5 至 1 ml 预冷的 PBS 洗涤 1-2 次。
- 4.由于变性裂解液效率更高，使用变性裂解液通常比使用天然裂解液蛋白产量高。
5. 如果使用非常少量的组织（<5mg），在塑料棒研磨匀浆后在室温下孵育 5 分钟可能会提高产量。
- 6.提取的蛋白质可在-80℃下长期保存。

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套管中或将吸头尖端剪掉
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用量
低蛋白浓度	增加起始细胞/组织的数量或减少细胞裂解液用量
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

