



北京百泰克生物技术有限公司

Bioteke Corporation

## 高效总蛋白裂解抽提试剂盒

目录号: PP8001 100次 A液 20ml B液 420ul

储存: 4℃或-20℃避光

### 产品描述:

本产品加入了特殊的非离子型去垢剂, 以及数种蛋白磷酸酶抑制剂, 能裂解细胞并在非变性条件下释放胞浆蛋白和可溶性膜蛋白、核蛋白, 同时维持了原有的蛋白间相互作用并保留了蛋白的特性和功能, 如抗原-抗体结合或酶学活性, 因此本试剂抽提得到得蛋白不仅适用于 Western blot, 免疫沉淀, 还适宜于进行蛋白活性功能检测和免疫共沉淀。由于加入了多种磷酸酶抑制剂, 尤其适宜于磷酸化蛋白的免疫共沉淀或 Western Blot 研究。

### 注意事项:

- 1、裂解蛋白的所有步骤都需在冰上或 4℃进行。
- 2、B 液剧毒, 严重损害呼吸道粘膜、眼睛及皮肤, 吸入、吞进或通过皮肤吸收后有致命危险。为了安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。一旦眼睛或皮肤接触了 B 液, 应立即用大量水冲洗之。凡被 B 液污染的衣物应予丢弃。

### ★提取步骤:

在使用前数分钟内在A液中加入A液体积1%的B液, 混匀。



北京百泰克生物技术有限公司

Bioteke Corporation

地 址: 北京海淀区留学人员创业园

电 话: 010-62951781

传 真: 010-62951781

网 址: [www.bioteke.com](http://www.bioteke.com)

Email: info@bioteke.com

**对于培养细胞**取100-200微升的AB混合液。

**贴壁细胞**，去除培养液，用PBS、生理盐水或无血清培养液洗一遍(如果血清中的蛋白没有干扰，可以不洗)。按照6孔板每孔加入100-200微升AB混合液的比例加入AB混合液。用枪吹打数下，使AB混合液和细胞充分接触。通常AB混合液接触细胞1-2秒后，细胞就会被裂解。

**对于悬浮细胞**，离心收集细胞，用手指把细胞用力弹散。按照6孔板每孔细胞加入100-200微升AB混合液的比例加入AB混合液。用手指轻弹以充分裂解细胞。充分裂解后应没有明显的细胞沉淀。如果细胞量较多，必须分装成50-100万细胞/管，然后再裂解。

**充分裂解后**，12000rpm离心3-5分钟，取上清，即可进行后续的PAGE、Western、免疫沉淀和免疫共沉淀等操作。

A液用量说明：通常6孔板每孔细胞加入100微升AB混合液已经足够，但如果细胞密度非常高可以适当加大AB混合液的用量到150微升或200微升。

**对于组织样品：**

- 1、在使用前数分钟内在A液中加入A液体积1%的B液，混匀配制成AB混合液。
- 2、称量1~20mg组织，将组织匀浆或用剪刀剪切成细小的碎片，碎片厚度小于2mm，也可以匀浆或液氮研磨。
- 3、加入200微升的AB混合液。
- 4、震荡混匀，冰浴（或4℃环境）裂解。裂解1~2小时。每隔1小时补加2微升100mM B液。（如果裂解不充分可以适当添加更多的AB混合液，如果需要高浓度的蛋白样品，可以适当减少AB混合液的用量。）
- 5、充分裂解后，12000rpm离心3-5分钟，取上清，即可进行后

续的PAGE、Western、免疫沉淀和免疫共沉淀等操作。

- 6、如果组织样品本身非常细小，可以适当剪切后直接加入A液裂解，通过强烈vortex使样品裂解充分。然后同样离心取上清，用于后续实验。直接裂解的优点是比较方便，不必使用匀浆器，缺点是不如使用匀浆器那样裂解得比较充分。

## ★蛋白浓度测定

构成蛋白质的20种氨基酸在可见光区都没有光吸收，但在近紫外区(220~300nm)酪氨酸 Tyr、苯丙氨酸 Phe 和色氨酸 Trp 有吸光能力。Tyr  $\lambda_{\max}$  是 275，Phe  $\lambda_{\max}$  是 257，色氨酸 Trp  $\lambda_{\max}$  是 280。测定浓度时一般默认以 280nm 处吸光度来计算浓度。

测定方法：

- 1、从得到的蛋白液体中取 10 微升加纯水 30 微升，充分混匀。
- 2、在 ND5000 超微量紫外可见分光光度计上，选中右侧“蛋白质”下拉菜单中“BSA”选项。用纯水做空白，扣完背景后加 3 微升上述稀释液开始测量。
- 3、因蛋白浓度高于 20mg/ml 或低于 0.1mg/ml 时，数据不准确，所以测量结果大于 20mg/ml 时，需再对次稀释样本进行进一步的稀释，直至浓度为 0.1~20mg/ml 之间。然后根据稀释倍数计算原浓度。

注：第一步稀释 4 倍不能省略，因为裂解抽提液在高浓度下会干扰浓度测试。

