

酵母膜蛋白提取试剂盒

货号: EX2100

规格: 50T/100T

保存: 2-8℃保存, 有效期 1 年。

产品内容:

名称	50T	100T	储存条件
酵母膜蛋白提取液 A	25ml	50ml	2-8℃保存
酵母膜蛋白提取液 B	25ml	50ml	2-8℃保存
膜蛋白溶解液 C	10ml	20ml	2-8℃保存
蛋白酶抑制剂混合物	100ul	200ul	-20℃保存

注:

1. 蛋白酶抑制剂未开盖使用前也可以2-8℃储存。开盖使用后-20℃储存。
2. 蛋白酶抑制剂在2-8℃低温时是固体状态, 从冰箱取出后恢复至室温或37℃短时间水浴, 变成液体状态后离心至管底部再开盖。
3. 试剂拆封后请尽快使用完!

产品简介:

跨膜蛋白承担各种生物功能, 膜蛋白样品的制备需要充分考虑到与下游的胶分析及质谱分析等应用配套, 因此膜蛋白样本制备成为一个难以逾越的挑战。

酵母膜蛋白提取试剂盒是一种高效的高产膜蛋白提取试剂盒, 酵母膜蛋白提取试剂盒可以从各种酵母样本中提取膜蛋白, 可用于纯化蛋白的粗品制备及膜蛋白制备。提取过程简单方便。

本试剂盒含有的独特配方能够有效溶解酵母总膜组份, 包括质膜、核膜和各种细胞器膜。本试剂盒含有的蛋白酶抑制剂混合物, 阻止了蛋白酶对蛋白的降解, 为提取高纯度的蛋白提供了保证。

本试剂盒提取的蛋白可用于 Western Blotting、蛋白质电泳、免疫沉淀、ELISA、转录活性分析、Gelshift 凝胶阻滞实验、酶活性测定等下游蛋白研究实验。

本试剂盒提取的蛋白为具有天然蛋白构象的活性蛋白。

本试剂盒中不含有 EDTA, 与金属螯和层析等下游应用兼容。

本试剂盒提取的蛋白样本含有高浓度的盐成分, 不可直接用于 2D 电泳, 如下游实验需要直接用于等电聚焦、双向电泳, 请使用其他货号的试剂盒。也可以将最后样品除盐后再用于 2D 电泳, 用脱盐柱脱盐处理。

产品特点:

1. 使用方便。
2. 含蛋白稳定剂, 提取的蛋白稳定。
3. 紫外检测蛋白浓度时, 背景干扰低。





4. 蛋白酶抑制剂抑制了蛋白的降解,蛋白酶抑制剂配方优化。蛋白酶抑制剂混合物包含 6 种独立的蛋白酶抑制剂;每一种抑制剂可特异性抑制某一种或几种蛋白酶活性。该混合物优化的组成使其可以抑制几乎所有重要的蛋白酶活性,包括丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、丙氨酰-氨基肽酶等。

自备试剂和仪器:

离心机、振荡器、涡旋混匀器、移液器、冰箱、冰盒, PBS 缓冲液、蛋白定量试剂盒、离心管、吸头、一次性手套。

使用方法:

一、使用注意事项:

1. 预实验很重要。必须要做预实验,在正式实验之前取少量样本优化实验条件,并像正式样本一样认真进行,看实验结果是否可行,实验条件是否适合自己的样本。由于生物样本的多样性,不同样本的实验条件通常差异较大,同种细胞的不同模型下需要的实验条件也可能不同,为了避免浪费正式样本和试剂,一定要提前预实验优化实验条件。
2. 旋帽离心管装的试剂在开盖前请短暂离心,将盖内壁上的液体甩至管底,避免开盖时液体洒落。
3. 实验过程中的所有试剂须预冷;所有器具须放-20℃冰箱预冷。整个过程须保持样品处于低温。
4. 提取液 B 在使用前须一直置于 2-8℃条件,否则下游膜蛋白提取时会导致不容易分层。
5. 蛋白酶抑制剂储存期间溶液如果出现沉淀,不影响使用,溶解后正常使用。
6. 可以根据自己实验需要加入其它蛋白酶抑制剂单品。

二、操作步骤:

1. 提取液制备:

每 500 μ l 酵母蛋白提取液 B 中加入 2 μ l 蛋白酶抑制剂混合物,混匀后置冰上备用。

【注】:

- 1) 根据需要处理的样品数量准备蛋白提取液,蛋白酶抑制剂混合物不可以一次全部加入提取液。
 - 2) 加过蛋白酶抑制剂的提取液一周内未使用完,再次使用前需要再次加入蛋白酶抑制剂。
 - 3) 提取液 B 在使用前须一直置于 2-8℃条件,否则下游膜蛋白提取时会导致不容易分层。
 - 4) 以下步骤中使用的蛋白提取液为此步配制好的含蛋白酶抑制剂的提取液。
2. 取适量酵母培养物,在 4℃, 2000 $\times$ g 条件下离心 5-10 分钟,小心吸取培养基,尽可能吸干,收集酵母沉淀。
 3. 用冷 PBS 洗涤酵母两次,每次洗涤后尽可能吸干上清。
 4. 每 100-200 μ l 体积酵母沉淀物中加入 500 μ l 酵母蛋白提取液 A,混匀后,在室温或 37℃条件下轻轻振荡 30 分钟-1 小时。

【注】:

- 1) 若后面步骤中试剂 B 处理时沉淀难以裂解,应延长此步试剂 A 的处理时间。
 - 2) 有些酵母样本细胞壁较厚,难以破壁,最长可以将试剂 A 处理时间延长至 8 小时。
5. 在 4℃, 2000 $\times$ g 条件下离心 5-10 分钟,移除上清,收集沉淀。



6. 在沉淀物中加入 500 μ l 冷的 (4°C) 酵母蛋白提取液 B, 混匀。

【注】:

1) 提取液 B 在使用前须一直置于 2-8°C 条件, 否则下游膜蛋白提取时会导致不容易分层。

7. 在 2-8°C 条件下轻轻振荡 15-45 分钟。

【注】:

1) 必须在 2-8°C 条件下处理。

2) 使用振荡器/摇床的较低转速, 提取液能轻微晃动即可。

3) 没有 2-8°C 振荡条件也可以不振荡, 稍微延长提取液的处理时间, 中间每隔几分钟用移液器吹打混匀即可。

4) 试剂 B 处理后沉淀应明显减少, 否则延长处理时间。

5) 若延长时间后沉淀仍难以裂解, 应延长试剂 A 的处理时间。

8. 将提取液在 4°C 条件下 12000 $\times$ g 离心 5 分钟, 取上清。

【注】:

1) 此时酵母膜蛋白已溶解于抽提液 B, 酵母菌体沉淀会减少, 若有大量未溶解酵母菌体, 请延长步骤 4 和步骤 7 的振荡时间, 振荡中途可用移液器吹打混匀。

9. 将上清在 37°C 水浴 10 分钟。

10. 在 37°C 1000 $\times$ g 离心 3 分钟。

【注】:

1) 此步骤必须在 37°C 离心。

2) 无 37°C 条件离心也可不离心, 延长 37°C 水浴时间至液体澄清, 分层明显即可。

11. 此时溶液分为 2 层, 小心移除上层部分, 留下管底部下层部分大约 30-50 μ l 液体。

【注】:

1) 下层为粘稠状液体。

12. 用 50-100 μ l 膜蛋白溶解液 C 溶解该下层溶液, 即得酵母膜蛋白样品。

【注】:

1) 膜蛋白比较难溶解, 不能很快溶解混匀, 可以在加入溶解液后稍微吹打混匀, 然后置于 4°C 冰箱静置至溶解。中途用移液器轻轻吹打混匀一次。静置后取出再次用移液器稍微吹打混匀即可。

2) 于 4°C 静置直至管底透明胶状物完全溶解。

13. 将上述蛋白提取物定量后分装于 -80°C 冰箱保存备用或直接用于下游实验。

【注】:

1) 建议用 BCA 法进行蛋白定量。

2) 蛋白样品 -80°C 存放一年没有问题。注意不要被蛋白酶水解掉, 不要被细菌污染。





常见问题分析:

1. 蛋白浓度低?

膜蛋白丰度较低, 需要加大细胞上样量。处理部分细胞样本时可能没有裂解完全, 导致蛋白浓度低。只要适当延长试剂 A 和 B 的处理时间即可。最好在持续振荡的条件下处理, 没有振荡器也可间隔几分钟用吸头吹打混匀。

2. 用什么方法定量蛋白?

建议用 BCA 法。不适合用 Bradford 法, 因为试剂中含有干扰 Bradford 法的组份, 导致定量不准。如果已经进行过透析处理或者用脱盐柱改换过缓冲体系, 则可以用 Bradford 法定量。

3. 提取的蛋白具有活性吗?

本试剂盒不含有离子型去垢剂组份, 不破坏蛋白的结构, 没有对蛋白质之间原有的相互作用的破坏, 蛋白均保持其天然构象和活性。

4. 膜蛋白电泳没有条带?

膜蛋白样品通常浓度较低, 电泳前一定要进行蛋白定量, 以保证电泳是蛋白上样量足够。膜蛋白提取好后, 用溶解液充分溶解后, 可以超声处理一下, 再进行蛋白定量。

蛋白加 Loading buffer 后可以不用煮沸, 采用 50°C 保温 30 分钟。

蛋白 Loading buffer 中 SDS 终浓度含量可以提高至 3%-10%。

有些样品的膜蛋白含量太低, 可以使用丙酮沉淀膜蛋白, 再使膜蛋白溶解于上样缓冲液中, 一般可以跑出清晰的蛋白条带。

电泳时最后采用低电压低电流电泳。

注意事项:

1. 正式实验前请选取几个样本做预实验, 以优化实验条件, 取得最佳实验效果。
2. 螺旋盖微量试剂管装的试剂在开盖前请短暂离心, 将盖和管内壁上的液体离心至管底, 避免开盖时试剂损失。
3. 禁止与其他品牌的试剂混用, 否则会影响使用效果。
4. 样品或试剂被细菌或真菌污染或试剂交叉污染可能会导致错误的结果。
5. 最好使用一次性吸头、管、瓶或玻璃器皿, 可重复使用的玻璃器皿必须在使用前清洗并彻底清除残留清洁剂。
6. 实验后完成后所有样品及接触过的器皿应按照规定程序处理。

