

产品组成:

规格	50T	100T
磷酸化蛋白提取液	25ml	50ml
蛋白酶抑制剂混合物	100ul	200ul

注意:

- 1、蛋白酶抑制剂混合物避免反复冻融。
- 2、如果试剂盒不能短时间内用完，蛋白酶抑制剂混合物不可以一次全部加入提取液。

储存条件: 蛋白酶抑制剂-20℃保存； 蛋白提取液 2-8℃保存。 **有效期:** 一年。

产品简介:

磷酸化蛋白提取试剂盒适用于从各种原代或传代细胞和各种实体组织，如脑、脊髓、神经结或纤维、脂肪、肝脏、消化道、肾脏、心脏、肌肉、血管、结缔组织等哺乳动物组织中提取磷酸化蛋白。提取过程简单方便，可在1小时内完成。该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。本试剂盒含有的独特配方能充分保护磷酸化蛋白的磷酸化，够溶解细胞膜包括细胞质膜和核膜。提取的蛋白可用于 Western Blotting、蛋白质电泳、免疫共沉淀等下游蛋白研究。

使用方法:

使用注意事项:

- 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。
- 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。
- 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。

➤ 细胞磷酸化蛋白提取:

1. 提取液制备: 每 500ul 冷的蛋白提取液中加入 2ul 蛋白酶抑制剂混合物，混匀后置冰上备用。
2. 取 $5-10 \times 10^6$ 个细胞^①，在 4℃，1000rpm 条件下离心 5-10 分钟，小心吸取培养基，尽可能吸干，收集细胞。
3. 用冷 PBS 洗涤细胞两次，每次洗涤后尽可能吸干上清。
4. 每 5×10^6 个细胞中加入 500ul 冷的蛋白提取液，混匀后，在 4℃条件下振荡 15-20 分钟。
5. 在 4℃，14000rpm 条件下离心 15 分钟。
6. 快速将上清吸入另一预冷的干净离心管，即可得到磷酸化蛋白。
7. 将上述蛋白提取物定量^②后分装于-80℃冰箱保存备用或直接用于下游实验^③。

注:

- ① 细胞数量根据实验情况调整，每次的裂解液用量并不是一定的，请根据实际情况调整。
- ② 建议用 BCA 法进行蛋白定量。
- ③ 蛋白样品-80℃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。

➤ 组织磷酸化蛋白提取:

1. 提取液制备: 每 500ul 冷的蛋白提取液中加入 2ul 蛋白酶抑制剂混合物，混匀后置冰上备用。
2. 取 100mg 组织样本剪碎，加入总蛋白提取液，用组织匀浆器匀浆至无明显肉眼可见固体^①。
3. 将组织匀浆吸入一预冷的干净离心管中，在 4℃，10000rpm 条件下离心 5 分钟。
4. 将上清吸入另一预冷的干净离心管，即可得到磷酸化蛋白。
5. 将上述蛋白提取物定量后分装于-80℃冰箱保存备用或直接用于下游实验。