

哺乳动物组织/细胞总蛋白提取试剂盒使用说明书

【包装规格】

产品编号	产品名称	包装
EK-6200	哺乳动物组织/细胞总蛋白提取试剂盒	100T/500T
EK-6200-A	Total Protein Extraction Buffer	20mL/100mL
EK-6200-B	Protease and Phosphatase Inhibitor Mixture (50×)	0.5mL/1mL×2 管
	使用说明书	1 份

【保存条件】

EK-6200-A 于 4°C 保存，EK-6200-B 于 -20°C 保存，有效期 12 个月

【概述】

本试剂盒专为从哺乳动物组织和培养细胞中快速提取总蛋白而设计。配套的高效蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂混合物，能够有效防止蛋白的降解及去磷酸化修饰。

作用强劲：裂解效率高，可在短时间内获得高浓度的总蛋白。

应用广泛：提取的蛋白可直接用于 Western Blot、SDS-PAGE、ELISA 等基础研究。

双重保护：特别添加磷酸酶抑制剂，适用于信号转导及磷酸化蛋白的研究。

【使用建议】

1. **裂解工作液配制（现用现配）：**取 1 mL 预冷的 Total Protein Extraction Buffer，加入 20 μL 抑制剂混合物 (50×)。充分混匀后置于冰上备用。

2. 样品前处理（全程冰上处理）

贴壁细胞：弃去培养基，用 PBS 洗涤 1-2 次。按 6 孔板每孔加入按 6 孔板每孔加入 150–250 μL 含抑制剂裂解液（参考下表）。充分吹打混匀，冰上裂解 5 分钟，期间上下颠倒混匀 2-3 次。

悬浮细胞：弃去培养基，用 PBS 洗涤 1-2 次，离心收集细胞，弃上清。按 50-100 万细胞/管的量，加入 150–250 μL 含抑制剂裂解液，充分吹打混匀，冰上裂解 5 分钟，期间上下颠倒混匀 2-3 次。

组织样品：称重后将组织剪碎。按 20 mg 组织/ 150 - 250 μL 工作液的比例加入含抑制剂裂解液。使用玻璃匀浆器或电动匀浆器直至组织充分裂解。注：若需高浓度蛋白，可适当减少裂解液用量。

3. 后处理与收集

- ① **离心**：将裂解后的样品 4℃、10,000-13,000×g 条件下离心 5-10 分钟
- ② **收集蛋白**：取上清。推荐使用 BCA 法 (EK-5001) 测定蛋白浓度。所得蛋白样品即可进行后续 SDS-PAGE、Western Blot 等操作。

【附表：不同培养器皿的裂解液参考用量】

为了达到最佳的裂解效果（通常蛋白浓度在 2-4 mg/mL），细胞长满（100%汇合度）时建议参考下表进行加液：

培养器皿类型	培养面积 (cm ²)	细胞数量(个)	裂解液建议用量 (μL)
6 孔板 (每孔)	9.5	1×10 ⁶	150-250
3.5cm 培养皿	8	1×10 ⁶	150-250
6cm 培养皿	21	2.5×10 ⁶	400-500
10cm 培养皿	55	7×10 ⁶	1000
T25 培养瓶	25	3×10 ⁶	500

【注意事项】

1. **提升产量**：为获取更多蛋白，可将裂解后的样品置于冰上延长裂解 5-10 分钟（期间可每隔 2 分钟震荡一次）。
2. **“胶状物”处理**：裂解过程中出现透明粘稠的胶状物属正常现象，该物质为基因组 DNA 与蛋白质形成的复合物。请根据实验目标选择处理方式：**常规检测（推荐）**：若检测胞浆蛋白或多数核蛋白（如常见的转录因子 NF-kappaB、p53 等），无需特殊处理。直接于 4℃ 高速离心，取上清液即可满足后续实验需求。**深层检测（超声处理）**：若需检测与基因组 DNA 结合极其紧密的蛋白（如组蛋白、染色质重塑复合物等），建议在离心前进行冰上超声处理（短脉冲，避免产热）。超声可机械性打碎 DNA 链，释放结合蛋白，从而提高此类蛋白的提取回收率。
3. **温控要求**：为防止蛋白降解，所有操作务必在冰上或 4℃ 进行。
4. **安全防护**：含有化学去污剂，请佩戴实验服及一次性手套操作。