

FFPE 组织切片总蛋白提取试剂盒 (WB&RPA) 说明书

【包装规格】

产品编号	产品名称	包装
EK-5012	FFPE Tissue Total Protein Extraction Kit (Western Blot & RPA)	100T/500T
EK-5012-A	Buffer EXB 蛋白提取液	12mL/60mL
EK-5012-B	β -巯基乙醇	1m/5mL
	使用说明书	1 份

【保存条件】

-20°C 保存, 有效期 12 个月, β -巯基乙醇 4°C 避光保存, 有效期 12 个月

【概述】

本产品用于从福尔马林固定、石蜡包埋 (FFPE) 组织切片中提取总蛋白, 下游可用于 Western blot 和 RPA (反相蛋白阵列) 实验。该试剂盒优化了提取条件, 确保从旧 FFPE 样本或过度固定的组织中获得高效率的全长完整蛋白, 提取效率与冷冻组织相当。适用于临床和研究样本的蛋白质组学分析。

【使用说明】

一、样品前处理

样本质量: 组织取样后建议尽快固定 (4-10%福尔马林, 14-24 小时)。固定超过 24 小时或保存数年的陈旧蜡块蛋白产量可能略有下降。

推荐起始量: 2-3 个 10-15 μ m 厚、100 mm² 面积切片。蛋白产量因组织类型而异 (例如, 人结肠~530 μ g/5 切片)。

I. 载玻片 FFPE 前处理 (适用于安装在显微镜载玻片上的切片)

- 二甲苯脱蜡:** 将载玻片完全浸没于二甲苯中, 室温孵育 10 min。重复此步骤 2 次 (共 3 次)。
- 梯度乙醇复水:** 依次在 100%乙醇、96%乙醇、70%乙醇中各孵育 10 min。每种浓度均需重复操作一次。
- 收集:** 浸入双蒸水中 30 s, 敲干余水。用针刮取感兴趣区域组织, 转移至 1.5mL 离心管中, 立即提取。

II. FFPE 石蜡块前处理 (适用于直接从 FFPE 样本块切割的切片)

- 二甲苯脱蜡:** 向含切片的管中加入 1mL 二甲苯, 剧烈涡旋 10 s, 孵育 10 min。14,000 \times g 离心 2 min, 弃上清。重复 2 次 (共 3 次)。
- 梯度乙醇复水:** 依次在 100%乙醇、96%乙醇、70%乙醇中各孵育 10 min。14,000 \times g 离心 2 min, 弃上清。重复 2 次 (共 3 次)。每种浓度均需重复操作一次。
- 收集:** 最后一次离心后, 尽可能吸干残留液体, 注意勿扰动松散的组织沉淀。

二、总蛋白提取（核心步骤）

1. **配制工作液：**每 94 μL Buffer EXB 加入 6 μL β -巯基乙醇（现用现配）。
2. **裂解：**向含组织沉淀的管中加入 100 μL 工作液，涡旋混合。（在通风橱中进行）
3. **冰浴预冷：**在冰上孵育 15min，然后涡旋混合，期间间歇涡旋。
4. **高温脱交联：**使用封口膜或密封夹加固管盖并置于 100 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20min。

注意：务必使用封口膜或密封夹加固管盖，防止高温孵育时爆裂。

5. **持续修复：**转移至恒温震荡器，在 80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以 750 rpm 震荡孵育 2 小时。

6. 冷却与收集：

- ① 孵育结束，取出后立即置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境（或冰上）静置 1min 以平衡压力。
- ② 移除封口膜或密封夹在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 14,000 $\times\text{g}$ 离心 15min。
- ③ 小心收集上清液（即提取的总蛋白）至新管中。

7. **蛋白定量：**提取液含高浓度去垢剂和还原剂，严禁使用常规 BCA 法。建议使用商业试剂盒（如 EK-5004 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒（去垢剂兼容型）。稀释上清液 1:3-1:100，进行管式或微板测定。

【注意事项】

1. **起始材料质量影响产量：**固定时间过长（>24 小时）或储存不当会降低效率或条带弥散。
2. **低产量故障排除：**检查起始材料量、脱石蜡彻底性；如样本含过多石蜡，用手术刀移除。
3. **蛋白定量：**确保使用兼容还原剂的蛋白测定试剂盒进行蛋白定量。
4. **结晶析出：**Buffer EXB 低温下可能析出为正常现象，使用时 37 $^{\circ}\text{C}$ 复温即可溶解。
5. **安全防护：**为了您的安全与健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
6. **科研用途：**该试剂仅用于科研领域，不宜用于临床诊断或其他用途。