

细菌膜蛋白提取试剂盒

产品货号：26256

产品规格：50T/100T

产品简介：

细菌膜蛋白提取试剂盒是一种高效的高产膜蛋白提取试剂盒。细菌膜蛋白提取试剂盒可以从各种菌体中提取膜蛋白，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细胞膜组份，试剂盒含有蛋白酶抑制剂混合物，阻止了蛋白酶对蛋白的降解，为提取高质量的蛋白提供了保证。

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、Gel shift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。

产品组成：

产品名称	50T	100T	保存
细菌膜蛋白提取液A	25ml	50ml	2-8°C
细菌膜蛋白提取液B	250μl	500μl	2-8°C
膜蛋白溶解液C	10ml	20ml	2-8°C
蛋白酶抑制剂混合物	100μl	200μl	-20°C

注：

1. 蛋白酶抑制剂未开盖使用前也可以2-8°C储存。开盖使用后-20°C储存。
2. 蛋白酶抑制剂在2-8°C低温时是固体状态，从冰箱取出后恢复至室温或37°C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。

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。

产品特点：

1. 使用方便，从细菌中提取蛋白不需经过超声破碎等前处理。
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。
5. 本品可用于革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌。
6. 本品不含EDTA，可以用于金属螯合层析等下游应用。

使用方法：

一、使用注意事项：



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

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。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。
4. 蛋白酶抑制剂在2-8℃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。
5. 提取液A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。
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. 提取液准备：

每500μl冷的提取液A中加入5μl提取液B和2μl蛋白酶抑制剂混合物，充分混匀后置冰上备用。

【注】：

- 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。
- 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。
- 蛋白样品用于测定某些蛋白酶活性等下游实验时，注意根据实际情况调整抑制剂混合物是否加入。
- 提取液A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。
- 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. 离心收菌体，用PBS洗菌体2次。

【注】：

- 加入PBS重悬混匀，5000×g离心10分钟。
- 不同菌种需要的离心力有差异，可以根据实际情况调整离心力，采用平时收集菌体的转速即可。

3. 按每100-150mg湿重菌体样本加入500μl冷的提取液A(大约菌体和提取液体积比1:3-1:5，完全淹没菌体即可)，吹打混匀，在2-8℃振荡1-2小时，至菌体裂解完全，液体澄清，菌体沉淀减少。

【注】：

- 必须在2-8℃条件下振荡。不可以室温振荡。
- 使用振荡器或摇床的较低转速，保持液体稍微晃动即可。可以盖紧离心管，将离心管倾斜放置或者横置，以利于液体振荡。
- 如果没有2-8℃持续振荡条件，也可直接置2-8℃冰箱静置1-2小时，中间每隔10分钟涡旋振荡混匀即可。
- 如果有超声条件，可以在40-300w，超声5s/间隔5s条件下超声几分钟，至澄清。超声有利于提高膜蛋白回收率。

4. 将菌液在2-8℃低温下12000×g离心5分钟，取上清。

5. 在37℃水浴10分钟。

6. 在37℃，1000×g离心3分钟。

【注】：

- 此步骤必须37℃条件下离心。
- 如果离心机不可控温，可以不离心，延长上一步骤水浴时间，至溶液分层清晰即可。或者在室温条件下离心，缩短离心时间至1分钟。

7. 此时液体分为2层，小心移除上层溶液，留管底部下层，大约50μl液体。

【注】：

- 下层为粘稠状液体。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

- 未完全分好层时看上去可能像3层，保留中间的界面层即可。
- 8. 用50-200 μ l冷的膜蛋白溶解液溶解该溶液，即得细菌膜蛋白样品。
【注】：
 - 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 $^{\circ}$ 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。
 - 静置直至管底透明胶状物完全溶解。
- 9. 将上述蛋白提取物定量后分装于-80 $^{\circ}$ C冰箱保存备用或直接用于下游实验。
【注】：
 - 建议用BCA法进行蛋白定量。
 - 蛋白样品-80 $^{\circ}$ 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，需要尽可能加大细胞上样量。处理部分组织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A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。
蛋白样品中含有去垢剂，注意蛋白定量方法的选择，防止不合适的方法导致的蛋白浓度数据异常偏高，从而导致依据错误的蛋白浓度数据上样导致上样量不够。
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 $^{\circ}$ 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。
5. 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。

有效期：12个月。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com