



植物内质网蛋白提取试剂盒（酶法）

货号：EX2060

规格：50T/100T

有效期：2-8℃保存，有效期一年

产品内容：

名称	50T	100T	储存条件
试剂 A：植物内质网蛋白提取液 A	25ml	50ml	2-8℃保存
试剂 B：植物内质网蛋白提取液 B	25ml	50ml	
试剂 C：植物内质网蛋白提取液 C	50ml	100ml	
试剂 D：植物内质网蛋白提取液 D	15ml	30ml	
试剂 E：蛋白酶抑制剂混合物	100μl	200μl	-20℃保存

注：

各组份储存条件：

蛋白提取液2-8℃保存

蛋白酶抑制剂-20℃保存。

提取液A长期不用请置-20℃保存。

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：

植物内质网蛋白提取试剂盒提供全套试剂，适用于从各种植物细胞和各种实体植物组织，如叶片、根、种子等植物组织中提取内质网蛋白。提取过程简单方便，制备的内质网蛋白不仅纯度高，保持天然活性，而且绝少交叉污染。

本试剂盒含有的独特配方能够有效溶解植物内质网组份。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、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。也可以将最后样品除盐后再用于2D电泳。

本试剂盒采用酶法提取，酶法提取制备的蛋白，回收率相比非酶法稍有提高，蛋白纯度高，但是耗时较长。非酶法提取过程简单方便，速度快，可在1小时内完成，绝少交叉污染，保持天然活性，但是蛋白回收率相比酶法较低。如果需要更加快捷的提取试剂盒，可以选择非酶法的提取试剂盒，对提取速度和蛋白活性没有要求的话，可以选择酶法提取试剂盒。请根据实际需要选择试剂盒。

自备试剂和仪器

离心机、振荡器、匀浆机/匀浆器、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。
- 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 AEBSF、Aprotinin、Leupeptin、Pepstatin A、Bestatin、E-64，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。

使用方法：

一、使用注意事项：

1. 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。
2. 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。
3. 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. 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300ul提取液D中加入2ul蛋白酶抑制剂混合物，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。

2. 取洗净擦干后并去除叶梗和粗脉的200-500mg植物组织样本用手术剪刀尽可能剪碎。

注：也可用锋利的刀片将叶片样本切成尽可能小的小方块(1-2mm)。

3. 加入500ul 试剂A，充分混匀。

注：可以将叶片组织在液氮中冷冻后稍微捣碎成细的粉末后再加入试剂A。

4. 在30℃条件下静置15分钟。

5. 在2000×g条件下离心10分钟，弃上清，收集沉淀。

6. 在沉淀中加入0.5ml提取液B，充分混匀。

注：培养细胞 1000xg条件下离心5分钟，小心吸取培养基，尽可能吸干，收集细胞后用PBS洗涤2次，然后直接加入提取液B重悬。

大约每300ul 细胞压积中加入 1ml提取液B。

根据实际样本体积调整提取液用量，一般试剂是样本体积的2-3倍，充分淹没样本即可。

7. 将提取液B样本悬液置振荡器37℃-45℃或室温振荡24-72小时。

注：使用振荡器/摇床的较低转速，提取液能轻微晃动即可。

没有振荡条件也可以不振荡，中间每隔几小时用移液器吹打混匀即可。

根据下游核糖体的应用选择合适的温度，最高温度为55℃时制备速度最快。但是温度过高会影响

样本活性，请根据下游应用选择温度。

不同类型的植物样本需要处理的时间差异较大。拟南芥较易处理，鲜嫩叶片较易处理，年龄小的样本处理时间短。拟南芥嫩叶最短4小时即可。

部分细胞壁较厚的植物类型可能需要处理更长时间。可以延长至72小时以上处理以提高得率。

8. 在2000×g离心10分钟，弃上清，收集沉淀。

注：有条件的话最好用100um细胞筛网过滤提取液B处理液后，收集滤液再离心。

没有细胞筛可以不过滤。

9. 在沉淀中加入1000ul 试剂C重悬沉淀，充分混匀。

10. 用匀浆机充分匀浆或者用Dounce匀浆器充分匀浆。

注：一般用Dounce匀浆器的匀浆30-40次。

每上下一个来回为一次。

11. 将匀浆液置4°C振荡20-30分钟。

注：用振荡器/摇床的较低转速，保持液体稍微有晃动即可。

没有低温振荡条件可以不振荡，在2-8°C静置，稍微延长处理时间，中间每隔几分钟用移液器吹打混匀。

12. 在500×g 条件下离心5分钟，弃沉淀，收集上清。

13. 在1000×g 条件下离心10分钟，弃沉淀，收集上清。

14. 将上清20000×g 离心10分钟。弃沉淀，取上清。

15. 将上清30000-50000×g 离心45分钟。弃上清，留沉淀。

注：如果条件允许，可将离心力加大到100000×g，有利于回收内质网小泡。

16. 在沉淀中加入100-300ul提取液D，充分混匀。

17. 置振荡器2-8°C振荡30分钟。

注：用振荡器/摇床的较低转速，保持液体有轻微晃动即可。

没有低温振荡条件可以不振荡，在2-8°C静置，稍微延长处理时间，中间每隔几分钟用移液器吹打混匀。

18. 在 4°C，12000×g 条件下离心15分钟。

19.将上清吸入另一预冷的干净离心管，即得到内质网蛋白。

20.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：建议用BCA法进行蛋白定量。

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？

植物核蛋白丰度比较低，在条件允许的情况下，尽可能增加样本量。

处理部分样本时可能没有裂解完全，导致蛋白浓度低。只要适当增加匀浆次数，并适当延长试剂B和C、D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D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。

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。