

## 植物膜蛋白/叶绿体蛋白提取试剂盒

货号: EX2360

规格: 50T/100T

有效期: 2-8°C保存, 有效期一年。

### 产品内容:

名称	50T	100T	储存条件
组分 A: 叶绿体提取液 A	100ml	200ml	2-8°C保存
组分 B: 叶绿体蛋白提取液 B	15ml	30ml	2-8°C保存
组分 C: 膜蛋白提取液 C	5ml	10ml	2-8°C保存
组分 D: 膜蛋白溶解液 D	20ml	40ml	2-8°C保存
组分 E: 蛋白酶抑制剂混合物	100μl	200μl	-20°C保存

### 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。

### 产品简介:

叶绿体是植物细胞所特有的能量转换细胞器, 光合作用就是在叶绿体中进行的, 由于具有这一重要功能, 所以叶绿体一直是细胞生物学、遗传学和分子生物学的重要研究对象。

叶绿体蛋白/膜蛋白提取试剂盒用简便快速的方法可以从各种植物样本中提取叶绿体蛋白和植物膜蛋白, 提取过程简单方便, 可在一小时内提取得到高质量的叶绿体蛋白和膜蛋白。

本试剂盒含有的独特配方能够有效溶解细胞膜组份, 包括细胞质膜、叶绿体膜。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。

### 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。
- 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。

## 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. 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。
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。
4. 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。
5. 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。
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 500ul 冷的蛋白提取液 C 和 D 中分别加入 1ul 蛋白酶抑制剂混合物，混匀后置冰上备用。

2. 取新鲜植物样本叶片，用纯水或 PBS 洗净擦干后去除叶梗和粗脉。

3. 用手术剪刀尽可能剪碎。

每 500mg-1g 新鲜植物叶片样本中加入 2ml 提取液 A，用匀浆机充分匀浆或用 Dounce 匀浆器充分匀浆。

4. 将匀浆用 100um 细胞筛过滤。

5. 将滤液 800×g 离心 3 分钟。将上清 (I) 移入另一干净离心管，留沉淀 (I) 待用。

6. 将上清 (I) 2000×g 离心 10 分钟。收集沉淀 (II)。将上清 (II) 吸出加入沉淀 (I) 中重悬沉淀 (I)，留重悬液 (A) 进行步骤 11 待用。

7. 在步骤 7 沉淀 (II) 中加入 200ul 提取液 B，充分混匀后，在 2-8℃ 振荡 20 分钟。

8. 将提取液在 4℃，12000×g 条件下离心 5 分钟，取上清，弃沉淀。

9. 即得叶绿体蛋白。

10. 在重悬液 (A) 中加入 80ul 提取液 C，充分混匀，置 2-8℃ 振荡 1-2 小时。

11. 在 37℃ 水浴 10 分钟。

12. 在 37℃，1000×g 离心 2 分钟。

13. 此时溶液分为两层，小心移除上层，保留下层溶液，下层体积大约 50ul 左右。

14. 在下层液体中加入 1-2 倍体积的溶解液 D，充分溶解，即得植物膜蛋白样品。

15. 将上述蛋白提取物定量后分装于 -80℃ 冰箱保存备用或调整相应的浓度后直接用于下游实验。

## 常见问题分析：

### 1. 蛋白浓度低？

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 CD 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？

- (1) 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。
- (2) 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。
- (3) 蛋白加 Loading buffer 后可以不用煮沸，采用 50℃ 保温 30 分钟。
- (4) 蛋白 Loading buffer 中 SDS 终浓度含量可以提高至 3%-10%。
- (5) 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。
- (6) 电泳时最好采用低电压低电流电泳。
- (7) 膜蛋白丰度通常较低，有条件可以尝试用银染染色。

## 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。