

产品介绍

对于磷酸化蛋白的检测，选择合适的刺激条件，是磷酸化蛋白检测中至关重要的一步。而蛋白的磷酸化是一个非常迅速的过程，在样本准备过程中，由于细胞被裂解，各种蛋白激酶和磷酸酶的释放会干扰待测蛋白的磷酸化水平。Proteintech研发的这款磷酸化蛋白提取试剂盒可以有效的提取磷酸化蛋白，防止样品在洗涤和裂解期间的去磷酸化。得到的磷酸化样品可用于蛋白免疫印迹、免疫沉淀、ELISA等蛋白分析实验。

关于试剂盒

- 为了防止去磷酸化，样品在预处理的清洗阶段应添加磷酸酶抑制剂混合物，在裂解阶段需要同时添加蛋白酶抑制剂混合物和磷酸酶抑制剂混合物。
- 对于药物处理过的样品推荐使用细胞刮收集细胞（连同培养基一起收集），不推荐使用胰酶消化和瓶内裂解。
- 本试剂盒提取的磷酸化蛋白样本不适合用于 phosphatase 酶切，如需酶切需选购 phosphatase 酶切的专用裂解液。
- 样品制备完成后及时使用或分装保存在-80℃。
- 试剂盒各组分需在室温完全解冻后再使用，试剂盒过期后建议不要使用

产品成分

组分	规格	保存条件
磷酸化蛋白裂解液	30 mL	-20℃ 保存一年
SDS-PAGE蛋白上样缓冲液（4X）	10 mL	-20℃ 保存一年
增强型蛋白酶抑制剂混合物（100X）	0.5 mL	-20℃ 保存一年
磷酸酶抑制剂混合物（100X）	1 mL	-20℃ 保存一年
0.4%台盼蓝溶液	1 mL	-20℃ 保存一年

30T

-20℃ 保存，一年有效。一个月内使用可4℃保存。

包装规格

保存条件

使用方法

1. 样品预处理

1.1 细胞样品：使用细胞刮收集细胞（连同培养基一起收集），4℃，500 g离心5 min，收集沉淀，沉淀用预冷的PBS（提前加入磷酸酶抑制剂混合物）洗涤两遍，收集细胞沉淀，尽可能吸取残留的PBS。

1.2 组织样品：现取新鲜的动物组织，用冰的PBS（提前加入磷酸酶抑制剂混合物）洗净组织块上附着的脂肪和血液等杂质，用滤纸吸干水分后称重，将组织块剪碎。

2. 样品裂解

2.1 细胞样品：按每1000万细胞加入1 mL预冷的磷酸化蛋白裂解液（提前加入新鲜的磷酸酶抑制剂混合物和蛋白酶抑制剂混合物），在冰上放置30 min，期间每10 min上下颠倒混匀一次。

2.2 组织样品

a. 液氮研磨法（效果最佳）：将剪碎的组织块在研钵中加入液氮，快速研磨至细粉状，转移至EP管中，按每100 mg组织加1 mL预冷的磷酸化蛋白裂解液（提前加入新鲜的磷酸酶抑制剂混合物和蛋白酶抑制剂混合物），使用移液器上下吹打混匀，直至完全溶解。

b. 匀浆法：按每100 mg组织加1 mL预冷的磷酸化蛋白裂解液（提前加入新鲜的磷酸酶抑制剂混合物和蛋白酶抑制剂混合物），将样品转移到合适大小的预冷玻璃匀浆器中，在冰浴条件下对样品匀浆30-50次。注：不同的样品所需匀浆次数不同。鉴定方法：取20 uL匀浆30次后的细胞样品或组织样品，加入等体积的0.4%台盼蓝溶液，混匀，在显微镜下观察台盼蓝溶液染色阳性（蓝色）细胞数目的比例，当阳性（蓝色）细胞完全破碎，即可停止匀浆。若阳性（蓝色）细胞破碎不完全，则可适当增加5-10次匀浆，随后按照同样的方法使用台盼蓝溶液进行鉴定。

c. 冷冻研磨法：提前开启冷冻研磨机预冷，将吸干水分的组织样本剪成1-2 mm左右的小块，按照每管100 mg分装到2 mL离心管，同时每管加入1粒5 mm的研磨珠。将离心管和适配器放入液氮里浸泡速冻。将离心管和适配器转移到冷冻研磨机，使用65HZ研磨45 s，如果研磨效果不理想可中断15 s后重复研磨一次。每管加1 mL预冷的磷酸化蛋白裂解液（提前加入新鲜的磷酸酶抑制剂混合物和蛋白酶抑制剂混合物），使用移液器上下吹打混匀，直至完全溶解。

注意：

- （1）优先推荐选用液氮研磨法和冷冻研磨法，其破碎效果最佳；如选用匀浆法，需在冰水浴中对样品进行匀浆。
- （2）使用冷冻研磨法对液氮速冻过的样本进行破碎，对离心管的材质要求比较高，需选用专用的离心管。

3. 超声处理：将裂解的蛋白样品放在冰上超声破碎，200 W，2 min（开2 s,关2 s），充分打断核酸序列。组织样品推荐200 W超声2 min后，冰上放置2 min后再重复200 W超声2 min一次。

4. 样品的使用与保存

4.1 用于免疫沉淀、ELISA等非变性蛋白分析实验，4℃，10000 g离心5 min分离上清，取部分样品用来测浓度，剩下的蛋白样品可直接分成数管保存在-80℃。

4.2 用于免疫印迹的变性蛋白分析实验，取部分样品用来测浓度，剩下的蛋白样品按照3：1比例，混合蛋白样品和SDS-PAGE上样缓冲液。100℃沸水浴加热5 min，以充分变性蛋白。冷却至室温后，4℃，10000 g离心5 min分离上清，可直接上样到SDS-PAGE胶加样孔或分成数管保存在-80℃。

注意：用于免疫印迹的变性蛋白分析，在加入SDS-PAGE上样缓冲液煮样后再离心，可提高总蛋白的得率。

1. 提取磷酸化蛋白的所有步骤都需在低温下进行。

2. SDS-PAGE蛋白上样缓冲液中含少量DTT，有轻微刺激性气味，但不含剧毒的巯基乙醇。为取得最佳的使用效果，尽量避免过多的反复冻融，可以适当分装使用。

3. 本试剂盒中的磷酸化蛋白裂解液制备的样品不适合由于 phosphatase 酶切，如需酶切需选购 phosphatase 酶切的专用裂解液。

4. 提取得到的磷酸化蛋白可以使用Proteintech的BCA蛋白浓度检测试剂盒（货号：PK10026）测定蛋白浓度，不适用Bradford法测蛋白浓度。

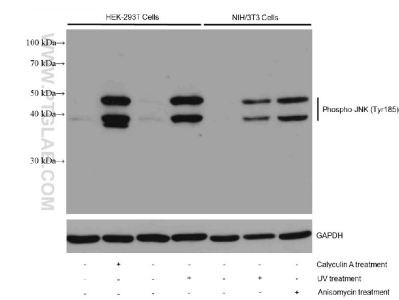
注意

问题解答

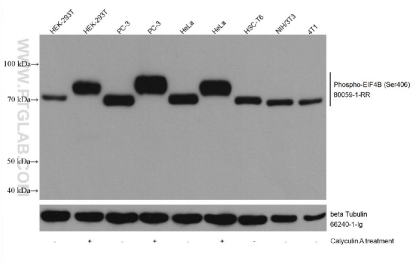
5. 本试剂盒中试剂都应在室温下溶解，请勿加热。
6. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴好一次性手套操作。

问题	可能原因	解决方案
磷酸化样品提取不成功	药物刺激是否合适	查找合适的刺激条件
	磷酸酶抑制剂混合物和蛋白酶抑制剂混合物没添加或加入量不足	增加新鲜且足量的磷酸酶抑制剂混合物和蛋白酶抑制剂混合物
	制样没有保持低温操作	全程保持低温操作

Validation Data



抗体: Phospho-JNK (Tyr185); 货号: 80024-1-RR;
上样量: 30 ug; 稀释度: 1:2000; 曝光时间: 5 min.



Non-treated and Calyculin A treated cells were subjected to SDS PAGE followed by western blot with 80059-1-RR (Phospho-EIF4B (Ser406) antibody) at dilution of 1:2000 incubated at room temperature for 1.5 hours.