

产品介绍

消化系统（胃肠道等）、生殖系统（睾丸、卵巢等）、腺状体（胰腺、胸腺等）、肺、肝脏、斑马鱼及一些易降解的细胞（如：巨噬细胞类RAW 264.7、淋巴细胞类U-937、单核细胞类THP-1）等样品，含有丰富的蛋白酶，在制样过程中会被释放到裂解液中，将靶标蛋白内源性剪切而碎片化，形成片段更小的杂带，从而增加了我们蛋白提取的难度。Proteintech研发的这款易降解蛋白提取试剂盒通过改进裂解液组分，能够有效的防止样品在制备过程中的降解，同时此款试剂盒提供了非变性和变性两款裂解液，客户可根据下游检测选择合适的裂解液。得到的蛋白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

- 本试剂盒提供了两款裂解Buffer，易降解蛋白裂解BufferA是一款变性裂解Buffer，提取的样品仅推荐使用SDS-PAGE，免疫印迹等实验，而裂解BufferB是一款基于非变性去垢剂来制备与多数下游检测兼容的裂解物，包括蛋白免疫印迹、免疫沉淀、ELISA检测，蛋白质分析等。
- 用于SDS-PAGE，免疫印迹等变性蛋白的研究，推荐使用易降解蛋白裂解BufferA，其具有更强的裂解能力，能有效阻止蛋白酶对蛋白的降解，保护目标蛋白完整性。
- 易降解蛋白裂解BufferA在低温下会析出，可使用30℃水浴复溶。
- 易降解蛋白裂解BufferA和B在使用前加倍添加新鲜的蛋白酶抑制剂混合物（即1 mL加入20-30 uL），用于磷酸化样本的制备推荐使用专用的磷酸化蛋白提取试剂盒（货号：[PK10023](#)）。
- 此试剂盒适用于消化系统（胃肠道等）、生殖系统（睾丸、卵巢等）、腺状体（胰腺、胸腺等）、肺、肝脏、斑马鱼及一些易降解的细胞（如：巨噬细胞类RAW 264.7、淋巴细胞类U-937、单核细胞类THP-1等）等样品。
- 样品制备完成后及时使用或分装保存在-80℃。
- 如果每个样品的数量为1000万个细胞或100 mg组织，本试剂盒可以处理30个样品。
- 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
易降解蛋白裂解BufferA	30 mL	-20℃保存一年
易降解蛋白裂解BufferB	5 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
0.4%台盼蓝溶液	1 mL	-20℃保存一年

包装规格

30T

保存条件

-20℃保存，一年有效。一个月内使用可4℃保存。

使用方法

1. 易降解类细胞（如：巨噬细胞类RAW 264.7、淋巴细胞类U-937、单核细胞类THP-1等）：使用离心法收集细胞

1.1 使用细胞刮收集细胞悬液（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（使用前添加新鲜的蛋白酶抑制剂混合物）洗涤两遍，收集细胞沉淀，尽可能吸取残留的PBS。

1.2 按每1000万细胞加入1 mL易降解蛋白裂解BufferA或B（蛋白裂解Buffer在使用前添加新鲜的蛋白酶抑制剂混合物）。

注意：

- （1）加入易降解蛋白裂解BufferA后，样品粘度会很高，无需在冰水放置30 min，可以直接冰浴进行超声破碎。
- （2）使用易降解蛋白裂解BufferA的操作，温度过低会析出，推荐在4℃冰箱或加冰块的泡沫箱中操作即可。如果出现温度过低样品析出的情况，可将样品放在室温直至重新复溶。
- （3）用于IP、CO-IP、ELISA检测等实验选用易降解蛋白裂解BufferB制备样品，不要选用易降解蛋白裂解BufferA制备。

2. 易降解组织样本：消化系统（胃肠道等）、生殖系统（睾丸、卵巢等）、腺状体（胰腺、胸腺等）、肺、肝脏等。

2.1 组织的采集与保存

- （1）采集组织样本前先对动物去除血液（血液去除越干净越好），接着迅速解剖，采集所需要的组织样本，浸泡在添加了增强型蛋白酶抑制剂混合物冰的PBS中。
- （2）消化系统（胃肠道等）、生殖系统（睾丸、卵巢等）、腺状体（胰腺、胸腺等）、肺、肝脏、斑马鱼及一些易降解的细胞（巨噬细胞和淋巴细胞类）等样品现取现制备，不推荐冻存。

2.2 组织样清洗

- （1）对于血液含量丰富的易降解组织样本如：肝脏、肺等组织，剪碎使用添加了增强型抑制剂混合物冰的PBS洗涤液清洗2-3遍（可以适当按压排出血液），直至样本血红色变浅，滤纸吸干水分称重。
- （2）对于脂肪含量丰富的易降解组织样本，预先把样本放在几层纸巾上按压，去除部分脂类，然后再使用添加了增强型抑制剂混合物冰的PBS清洗1-2遍，滤纸吸干水分称重。
- （3）对于胃肠道等易降解组织样本：剥离干净胃肠道表面的脂肪，然后使用注射器吸取含有增强型抑制剂混合物的PBS对胃肠道里面进行冲洗数次（请勿直接剪开刮洗，容易丢失胃肠道表面肠黏膜等相关蛋白），直至流出的PBS干净无异物，滤纸吸干水分称重。

2.3 组织样破碎及裂解

a. 液氮研磨法：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预冷的易降解蛋白裂解BufferA或B（蛋白裂解Buffer在使用前添加新鲜的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. 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**预冷的组织样品裂解**BufferA**或**B**（蛋白裂解**Buffer**在使用前添加新鲜的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机法，其破碎效果最佳；不推荐使用匀浆法，匀浆法易产生热量，加快降解。
- （2）使用冷冻研磨机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）用于**SDS-PAGE**，免疫印迹等变性蛋白的研究，推荐使用易降解蛋白裂解**BufferA**，其具有更强的裂解能力和阻止蛋白酶对蛋白的降解，能有效的保护目标蛋白完整性。
- （4）加入易降解蛋白裂解**BufferA**后，样品粘度会很高，无需在冰水放置**30 min**，可以直接冰浴进行超声破碎。
- （5）使用易降解蛋白裂解**BufferA**的操作，温度过低会析出，推荐在**4℃**冰箱或加冰块的泡沫箱中操作即可。如果出现温度过低样品析出的情况，可将样品放在室温直至重新复容。
- （6）用于**IP**、**CO-IP**、**ELISA**检测等实验选用易降解蛋白裂解**BufferB**制备样品，不要选用易降解蛋白裂解**BufferA**制备。

3. 斑马鱼等冷血动物类：推荐匀浆法

- （1）取适量易降解蛋白裂解**BufferA**或**B**（蛋白裂解**Buffer**在使用前添加新鲜的蛋白酶抑制剂混合物），在**70℃**水浴锅中预热。
 - （2）将清洗干净的斑马鱼吸干水分，按每**100 mg**组织加**1 mL**预热的组织样品裂解**BufferA**或**B**，在**70℃**水浴锅中匀浆**30-50**次。期间可取适量样品使用台盼蓝染色鉴定破碎程度，直至完全破碎。
- 鉴定方法：取**20 uL**匀浆**30**次后的样品，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。

4. 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**），冰上放置**2 min**后再重复**200 W**超声**2 min**一次，充分打断核酸序列。

5. 样品的使用与保存

- 5.1** 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**-20℃**或**-80℃**。
- 5.2** 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**-20℃**或**-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。

注意

- 1. 提取的易降解蛋白样品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. 提取得到的总蛋白可以使用**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。
- 4. 本试剂盒中试剂都应在室温下溶解，请勿加热。
- 5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴好一次性手套操作。

问题解答

问题	可能原因	解决方案
裂解不充分	裂解液加入量过少	加充足的裂解液
样品浓度低	裂解液加入量过多	减少加入的裂解液
样品粘度大	核酸未被打断成小片段	对样品进行超声波处理
离心后沉淀多	裂解不充分	加大裂解液的使用量

Validation Data

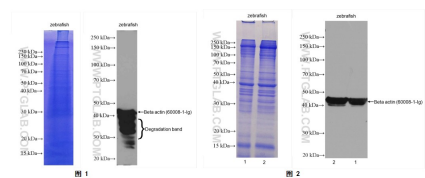


图1 RIPA制样。上样量：30 ug；胶浓度：8-18%；
抗体：Beta actin；货号：60008-1-Ig；稀释度：
1:10000；曝光时间：1 min；图2 使用易降解蛋白
提取试剂盒（货号：PK10024）制样。上样量：30
ug；胶浓度：8-18%；抗体：Beta actin；货号：
60008-1-Ig；稀释度：1:10000；曝光时间：1
min；lane1: 易降解蛋白裂解BufferB制备；lane2:...