



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

http:// www.real-tims.com.cn

E-mail: real-times@vip.163.com

植物总蛋白提取试剂盒-通用型 Plant Total Protein Isolation Kit (for general use)

● 产品货号及规格

产品编号	名称	规格	贮存
RTD8103-01	试剂 A-样本杂质去除剂	20 ml	4℃
RTD8103-02	试剂 B-植物蛋白提取缓冲液 II	15 ml	4℃
RTD8103-03	试剂 C-蛋白纯化剂	15 ml	4℃ 避光
RTD8103-04	试剂 D-漂洗缓冲液	10 ml	-20℃
RTD8103-05	溶液 E-蛋白沉淀剂	40 ml	常温(配制后 4℃)
DT0140P-01	1M DTT	1 ml	4℃ (配制后-20℃)
PC2030-03	蛋白酶抑制剂混合物 (100×,植物样品用)	0.2 ml	-20℃
PL080-01	5×MonoClolor 蛋白上样缓冲液(变性, 还原)	1 ml	-20℃

● 产品简介

本产品能够有效裂解各种植物器官（如叶片，根，茎，果实，种子，花），去除各种植物样品（包括富含次生代谢物质和多糖多酚的植物）中常见的污染，如多糖，多酚，脂类，色素，次生代谢物等，得到的高纯度蛋白样品，可以用于 SDS-PAGE 凝胶电泳，Western 印迹分析以及双向电泳（2D 电泳）。

该试剂盒含有除丙酮外的其他所有试剂，使用方便，能在 3 小时内得到高纯度的蛋白样品。

按照每次提取使用 0.7ml 试剂 B 计算，该试剂盒可以至少使用 20 次。

● 使用方法：

实验准备材料：

液氮；研钵；1.5ml 离心管；一次性注射器；丙酮；80%丙酮；70℃水浴锅；干浴器；冷冻离心机；制冰机；涡旋振荡器。

一. 样品破碎：

1.1 取植物样本，在液氮条件下，用研钵充分研磨成粉末。

关键步骤：此步骤非常重要，样本研磨越细越好，研磨不彻底会导致蛋白浓度偏低。

二. 沉淀杂质：

2.1 取 1.5 ml 离心管，加入 1 ml 即用型试剂 A（按照下表配制），迅速将约 0.1 克粉末加入其中，漩涡混匀，RT 放置 5 分钟。

关键步骤：样品粉末量不能超过 0.1 克，否则将导致蛋白提取得率和纯度大大降低。

即用型试剂 A-样本杂质去除剂配制

	即用型试剂 A		
	1 个样品	2 个样品	n 个样品
试剂 A-样本杂质去除剂	0.5 ml	1 ml	n×0.5 ml
丙酮	0.5 ml	1 ml	n×0.5 ml
1M DTT	10 μl	20 μl	n×10 μl

2.2 12000g 4℃ 离心 5 分钟，去除上清，保留沉淀。

注：观察沉淀颜色，如沉淀颜色为绿色，继续步骤 2.3；如沉淀颜色为浅色或白色，直接进行步骤 2.4。

2.3 沉淀中加入 1 ml 即用型试剂 A，漩涡混匀，RT 放置 5 分钟，12000g 4℃ 离心 5 分钟。

2.4 沉淀中加入 1 ml 预冷的丙酮（自备，试剂盒不提供）和 10 μl DTT 溶液，漩涡震荡（此时溶液状态应为白色悬液），彻底重悬，12000g 4℃ 离心 5 分钟，去除上清，收集沉淀。

2.5 快甩离心数秒，残留上清用移液器彻底吸弃，沉淀物通风晾干 1-2 分钟至沉淀干燥。

关键步骤：沉淀不能过分干燥，否则会影响以下步骤蛋白的溶解性。

三. 蛋白粗提：

3.1 蛋白沉淀中加入 0.7 ml 即用型试剂 B（按照下表配制），漩涡震荡，彻底重悬沉淀（此时溶液状态为淡蓝色的悬浮溶液）；70℃水浴 1 小时，间歇混匀。

即用型试剂 B-植物蛋白提取缓冲液配制：

	即用型试剂 B		
试剂 B-植物蛋白提取缓冲液 II	0.7 ml	5 ml	10 ml
蛋白酶抑制剂混合物（100×）	7 μl	50 μl	100 μl
1M DTT	7 μl	50 μl	100 μl

3.2 12000g 4℃离心 10 分钟，小心取上清（通常可取 600 μl，溶液为淡蓝色）于 1.5ml 离心管中，不要吸取沉淀。

注：此步骤得到的蛋白溶液可以进行大多数蛋白实验，如 WB。如要进行双向电泳（2D 电泳）实验，继续以下步骤。

四. 蛋白纯化：

4.1 加入与上清等体积的试剂 C（注：试剂 C 上层为保护相，应该吸取下部的淡黄色液体），剧烈颠倒震荡后常温放置 1-2 分钟，12000g RT 离心 5 分钟，溶液分成两层，上层溶液为蓝色，蛋白位于下层溶液中。

注：试剂 C 有腐蚀性，请在通风橱内操作，注意防护。

4.2 用一次性注射器小心吸取下层溶液（通常可取 350 μl）于 1.5 ml 离心管中，加入等体积试剂 D，剧烈

颠倒混匀，12000g RT 离心 5 分钟，蛋白位于上层溶液中，收集上层溶液（通常可取 150-200 μ l）于 1.5ml 离心管中。

五. 蛋白沉淀：

5.1 蛋白溶液中加入 5 倍体积溶液 E（注意是否已经按照标签所示加入甲醇），颠倒混匀，此时可见有絮状沉淀生产，**-20℃ 沉淀 30 分钟**。

注：**微量蛋白的提取可以-20℃过夜沉淀。**

5.2 12000g 4℃ 离心 10 分钟，收集蛋白沉淀，去除上清。

注：**正常的蛋白沉淀接近无色，如颜色为褐色或淡黄色说明蛋白不纯，不能用于双向电泳实验。重复步骤 3.1-5.2，直至蛋白沉淀接近无色。**

5.3 沉淀中加入 1ml 溶液 E（注意是否已经按照标签所示加入甲醇），彻底重悬沉淀，12000rpm 4℃ 离心 5 分钟，弃上清。

5.4 沉淀中加入 1ml 预冷的 80%丙酮（自备，试剂盒不提供）和 10 μ l DTT，彻底重悬沉淀，12000g 4℃ 离心 5 分钟，弃上清。

5.5 快甩离心数秒，残留上清移液器彻底吸弃，沉淀物通风晾干 1-2 分钟至沉淀干燥。

关键步骤：沉淀不能过分干燥，否则不好溶解。

六. 蛋白溶解：

6.1 沉淀中溶解于适量 PBS 溶液或者适当体积样品缓冲液溶解，-20℃或-80℃贮存。

注：① 如进行双向电泳，样品溶于双向电泳样品缓冲液中；如进行单向电泳，样品溶于 **1×SDS-PAGE 上样缓冲液**中。

② 由于提取过程中使用了 DTT，为了避免 DTT 对蛋白浓度测定的干扰，蛋白定量时尽量选择 **Bradford 方法**。