

# 蛋白质提取的方法总汇

## 1、植物组织蛋白质提取方法

- 1、根据样品重量（1g 样品加入 3.5ml 提取液，可根据材料不同适当加入），准备提取液放在冰上。
- 2、把样品放在研钵中用液氮研磨，研磨后加入提取液中在冰上静置（3-4 小时）。
- 3、用离心机离心 8000rpm40min4℃或 11100rpm20min4℃
- 4、提取上清液，样品制备完成。

蛋白质提取液：300ml

- 1、1Mtris-HCl (PH8) 45ml
- 2、甘油 (Glycerol) 75ml
- 3、聚乙烯吡咯烷酮 (Polyvinylpyrrolidone) 6g

这种方法针对 SDS-PAGE，垂直板电泳！

## 2、植物组织蛋白质提取方法

三氯醋酸—丙酮沉淀法

- 1、在液氮中研磨叶片
- 2、加入样品体积 3 倍的提取液在-20℃的条件下过夜，然后离心（4℃8000rpm 以上 1 小时）弃上清。
- 3、加入等体积的冰浴丙酮（含 0.07%的  $\beta$ -巯基乙醇），摇匀后离心（4℃8000rpm 以上 1 小时），然后真空干燥沉淀，备用。
- 4、上样前加入裂解液，室温放置 30 分钟，使蛋白充分溶于裂解液中，然后离心（15℃8000rpm 以上 1 小时或更长时间以没有沉淀为标准），可临时保存在 4℃待用。
- 5、用 Bradford 法定量蛋白，然后可分装放入-80℃备用。

药品：

提取液：含 10%TCA 和 0.07%的  $\beta$ -巯基乙醇的丙酮

裂解液：2.7g 尿素 0.2gCHAPS 溶于 3ml 灭菌的去离子水中（终体积为 5ml），使用前再加入 1M 的 DTT65ul/ml。

这种方法针对双向电泳，杂质少，离子浓度小的特点！当然单向电泳也同样适用，只是电泳的条带会减少！

## 3、组织：肠黏膜

目的：WESTERN BLOT 检测凋亡相关蛋白的表达

应用 TRIPURE 提取蛋白质步骤：

含蛋白质上清液中加入异丙醇：（1.5ml 每 1mlTRIPURE 用量）

倒转混匀，置室温 10min

离心：12000 g，10min，4 度，弃上清  
加入 0.3M 盐酸胍/95%乙醇：（2ml 每 1mlTRIPURE 用量）  
振荡，置室温 20min  
离心：7500g，5 min，4 度，弃上清  
重复 0.3M 盐酸胍/95%乙醇步 2 次  
沉淀中加入 100%乙醇 2ml  
充分振荡混匀，置室温 20 min  
离心：7500g，5min，4 度，弃上清吹干沉淀  
1%SDS 溶解沉淀  
离心：10000g，10min，4 度  
取上清-20 度保存（或可直接用于 WESTERN BLOT）

**存在的问题：**加入 1%SDS 后沉淀不溶解，还是很大的一块，4 度离心后又多了白色沉淀，SDS 结晶？测浓度，含量才 1mg/ml 左右。

**解决：**提蛋白试剂盒，另外组织大小适中，要碎，立即加 2X BUFFER，然后煮 5—10 分钟，效果很好的。

#### 4、植物材料：水稻苗，叶鞘，根

- 1、200 毫克样品置于冰上磨碎
  - 2、加 lysis buffer，离心，10000rpm，4 度，5min 取上清
  - 3、重复离心 5min
- lysis buffer: urea np-40 ampholine 2-me pvp-40

#### 5、蛋白质样品制备

秧苗蛋白质样品的提取按 Davermal 等（1986）的方法进行。

100mg 材料剪碎后加入 10mgPVP-40(聚乙烯吡咯烷酮)及少量石英砂，用液氮研磨成粉，加入 1.5 ml 10% 三氯乙酸（丙酮配制，含 10mM 即 0.07%  $\beta$ -巯基乙醇），混匀，-20℃沉淀 1 小时，4℃，15000 r/min 离心 15 min，弃上清，沉淀复溶于 1.5ml 冷丙酮(含 10 mM  $\beta$ -巯基乙醇)，再于-20℃沉淀 1 小时，同上离心弃上清，（有必要再用 80%丙酮(含 10 mM  $\beta$ -巯基乙醇)所得沉淀低温冷冻真空抽干。

按每 mg 干粉加入 20  $\mu$ l（可调）UKS 液[9.5 M 尿素，5mM 碳酸钾，1.25%SDS，0.5%DTT(二硫苏糖醇)，2% Ampholine (Amersham Pharmacia Biotech Inc, pH3.5-10)，6% Triton X-100]，37℃温育 30min，期间搅动几次，28 度（温度低，高浓度的尿素会让溶液结冰）16000 r/min 离心 15 min，离心力越大时间长一点越好！上清即可上样电泳。或者-70 度保存

#### 6、植物根中蛋白质的抽取

- (1) sample, 液氮研磨
- (2) 装 1.5 ml centrifuge 用 tube
- (3) 加 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 700 ul
- (4) 12000 rpm, 4 度, 10-15minite
- (5) 取上层液, 蛋白质就在里面

地址: 杭州市西湖科技园西园八路 11 号

邮编: 310030

售后服务专线: 400-672-1817

销售电话: 0571-86056609 86059660

86054117 86055117

传真: 0571-86059660 86823529

网址: [www.top17.net](http://www.top17.net)