

## 制品的性能说明

货号	产品名称	组 分	数量	保存温度	用 途
JH0009	Co-IP/IP RIPA 细胞裂解液	Co-IP/IP RIPA 细胞裂解液	100ml	RT	用于制备 Co-IP/IP 蛋白样品
JH0011	强RIPA细胞裂解液 (WB)	WB 强RIPA细胞裂解液	100ml	RT	用于 Western Blot 杂交的蛋白样品提取, 可高效提取细胞膜、胞浆、细胞核蛋白。不能用于 Co-IP/IP 试验
JH0016	蛋白酶抑制剂混合物 A (100X)	蛋白酶抑制剂混合物 A (100X)	100μl	-20 ℃	用于非磷酸蛋白的研究
JH0017	蛋白酶及磷酸酶抑制剂混合物 ABC (100X)	蛋白酶抑制剂混合物 A (100X)	100μl	-20 ℃	用于非磷酸及磷酸化蛋白的研究
		磷酸酶抑制剂混合物 B (100X)	100μl	-20 ℃	
		磷酸酶抑制剂混合物 C (100X)	100μl	-20 ℃	

## 蛋白酶及磷酸酶抑制剂组分及抑制性能

	蛋白酶抑制剂混合物 A	磷酸酶抑制剂混合物 B	磷酸酶抑制剂混合物 C
组 分	104mM AEBSF 80μM Aprotinin 5mM Bestatin 1.5mM E-64 2mM Leupeptin 1.5mM Pepstatin A	100mM Sodium Fluoride 100mM Sodium Orthovanadate 400mM Sodium Tartrate 115mM Sodium Molybdate 200mM Imidazole	2.5mM (-)-p-Bromotetramisole oxalate 500μM Cantharidin 500nM Microcystin LR, Microcystis aeruginosa
抑制蛋白酶种类	Serine Aminopeptidases Cysteine Aspartic proteases	Acid phosphatases Alkaline phosphatases PTPs, ATPases, Acid phosphatases Acid and phosphoprotein Alkaline phosphatases	Alkaline phosphatases Ser/Thr phosphatases PP1 and PP2A

## 根据试验情况推荐选择组合

试 验 类 型	组合类型选择
Western Blot 杂交, 非磷酸化蛋白	JH0011 + JH0016
Western Blot 杂交, 非磷酸化及磷酸化蛋白	JH0011 + JH0017
Co-IP/IP 试验, 非磷酸化蛋白	JH0009 + JH0016
Co-IP/IP 试验, 非磷酸化及磷酸化蛋白	JH0009 + JH0017

## 第一部分、制备 Western Blot 杂交蛋白样品

1. 对于培养细胞样品 ( $0.5\sim 10\times 10^6$  个):

(1). A: 非磷酸化蛋白的提取: 在使用前数分钟内向 强RIPA细胞裂解液 (WB) 中, 加入蛋白酶抑制剂混合物 A (JH0016), 使其最终浓度为  $1\times$ 。如  $250\mu\text{l}$  强RIPA细胞裂解液 (WB), 加入  $2.5\mu\text{l}$  蛋白酶抑制剂混合物 A, 混合均匀, 待用。

B: 磷酸化蛋白的提取: 在使用前数分钟内向 强RIPA细胞裂解液 (WB) 中, 加入蛋白酶抑制剂混合物 A、磷酸酶抑制剂混合物 B、磷酸酶抑制剂混合物 C (JH0017)各  $2.5\mu\text{l}$ , 使其最终浓度为  $1\times$ 。如  $250\mu\text{l}$  强RIPA细胞裂解液 (WB), 加入  $2.5\mu\text{l}$  蛋白酶抑制剂混合物 A、 $2.5\mu\text{l}$  磷酸酶抑制剂混合物 B、 $2.5\mu\text{l}$  磷酸酶抑制剂混合物 C, 混合均匀, 待用。

注意: 加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂后的 强RIPA细胞裂解液 (WB) 可于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存 2 个月, 性能不会有下降; 加入 Benzonase 核酸酶 (C2001) 至终浓度为  $0.25\text{ U}/\mu\text{l}$ , 可有效降低样品粘度提高蛋白提取效率。

(2). 离心收集细胞, 弃上清。加入  $250\mu\text{l}$  上述配制好的裂解液, 枪头或旋涡振荡混合均匀。冰上放置 30min。

(3). 样品裂解后,  $13,000\text{ rpm}$  离心 5min, 取上清, 即为所提取蛋白。

2. 对于组织样品:

(4). 组织用研钵 (或匀浆器) 研磨充分至细小颗粒。

(5). 按照每  $10\text{ mg}$  组织加入  $250\mu\text{l}$  裂解液的比例加入裂解液。(如果裂解不充分可以适当增加裂解液, 如果需要高浓度的蛋白样品, 可以适当减少裂解液的用量), 冰上放置 30min。

(6). 样品裂解后,  $13,000\text{ rpm}$  离心 5min, 取上清, 即为所提取蛋白。

(7). 提取完蛋白后可利用 BCA蛋白浓度测定试剂盒 (SerfullCare, JH0019) 测定蛋白浓度。如蛋白提取过程中加入了 Benzonase 核酸酶消化核酸后, 样品可以直接 NanoDrop 测定吸光值进行蛋白相对定量。

## 第二部分、制备 Co-IP/IP 蛋白样品

1. 对于培养细胞样品 ( $0.5\sim 10\times 10^6$  个):

(1). A: 非磷酸化蛋白的提取: 在使用前数分钟内向 Co-IP/IP RIPA 细胞裂解液中, 加入蛋白酶抑制剂混合物 A (JH0016), 使其最终浓度为  $1\times$ 。如  $250\mu\text{l}$  Co-IP/IP RIPA 细胞裂解液, 加入  $2.5\mu\text{l}$  蛋白酶抑制剂混合物 A, 混合均匀, 待用。

B: 磷酸化蛋白的提取: 在使用前数分钟内向 Co-IP/IP RIPA 细胞裂解液中, 加入蛋白酶抑制剂混合物 A、磷酸酶抑制剂混合物 B、磷酸酶抑制剂混合物 C (JH0017)各  $2.5\mu\text{l}$ , 使其最终浓度为  $1\times$ 。如  $250\mu\text{l}$  Co-IP/IP RIPA 细胞裂解液, 加入  $2.5\mu\text{l}$  蛋白酶抑制剂混合物 A、 $2.5\mu\text{l}$  磷酸酶抑制剂混合物 B、 $2.5\mu\text{l}$  磷酸酶抑制剂混合物 C, 混合均匀, 待用。

注意: 加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂后的 Co-IP/IP RIPA 细胞裂解液可于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存 2 个月, 性能不会有下降。

(2). 离心收集细胞, 弃上清。加入  $250\mu\text{l}$  上述配制好的裂解液, 枪头或旋涡振荡混合均匀。冰上放置

30min。(3). 样品裂解后,  $13,000\text{ rpm}$  离心 5min, 取上清, 即为所提取蛋白。

2. 对于组织样品:

(4). 组织用研钵 (或匀浆器) 研磨充分至细小颗粒。

(5). 按照每  $10\text{ mg}$  组织加入  $250\mu\text{l}$  裂解液的比例加入裂解液。(如果裂解不充分可以适当增加裂解液, 如果需要高浓度的蛋白样品, 可以适当减少裂解液的用量), 冰上放置 30min。

(6). 样品裂解后,  $13,000\text{ rpm}$  离心 5min, 取上清, 即为所提取蛋白。

(7). 提取完蛋白后可利用 BCA蛋白浓度测定试剂盒 (SerfullCare, JH0019) 测定蛋白浓度。如蛋白提取过程中加入了 Benzonase 核酸酶消化核酸后, 样品可以直接 NanoDrop 测定吸光值进行蛋白相对定量。