上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co.， Ltd
电话：021-61312973　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：shyysw@sina.com

高尔基体蛋白提取试剂盒

货号：R32711

规格：50T，100T

保存温度：2-8℃保存，有效期 12 个月。

产品组份：

名称	50T	100T	储存条件
试剂 A：高尔基体提取液 A	20ml	40ml	2-8℃保存
试剂 B：高尔基体提取液 B	25ml	50ml	2-8℃保存
试剂 C：试剂 WT	1ml	1ml	2-8℃保存
试剂 D：高尔基体蛋白提取液 D	20ml	40ml	2-8℃保存
试剂 E：蛋白酶抑制剂混合	100μl	200μl	-20℃保存

注：

1. 蛋白酶抑制剂未开盖使用前也可以 2-8℃储存。开盖使用后-20℃储存。

2. 蛋白酶抑制剂在 2-8℃低温时是固体状态，从冰箱取出后恢复至室温或 37℃短时间水浴，变成液体状态后离心至管底部再开盖。

3. 试剂拆封后请尽快使用完！

产品说明：

高尔基体蛋白提取试剂盒提供全套试剂，适用于从各种动物细胞和实体软、硬组织样本的高尔基体提取。本试剂盒含有的蛋白酶抑制剂混合物，阻止了蛋白酶对蛋白的降解，为提取高纯度的蛋白提供了保证。

高尔基体（Golgi apparatus, Golgi bodies）是由许多扁平的囊泡构成的以分泌为主要功能的细胞器。又称高尔基器或高尔基复合体；高尔基体是由数个扁平囊泡堆在一起形成的高度有极性的细胞器。常分布于内质网与细胞膜之间，呈弓形或半球形，凸出的一面对着内质网称为形成面（forming face）或顺面（cis face）。凹进的一面对着质膜称为成熟面（mature face）或反面（trans face）。顺面和反面都有一些或大或小的运输小泡，在具有极性的细胞中，高尔基体常大量分布于分泌端的细胞质中。因其看上极像滑面内质网，因此有科学家认为它是由滑面内质网进化而来的。

高尔基体中的酶主要有糖基转移酶、磺基-糖基转移酶、氧化还原酶、磷酸酶、蛋白激酶、甘露糖苷酶、转移酶和磷脂酶等不同的类型。高尔基体的主要功能将内质网合成的蛋白质进行加工、对比分类、与包装，然后分门别类地送到细胞特定的部位或分泌到细胞外。

本试剂盒提取的蛋白可用于 Western Blotting、蛋白质电泳、免疫沉淀、ELISA、转录活性分析、Gel shift 凝胶阻滞实验、酶活性测定等下游蛋白研究实验。

本试剂盒提取的蛋白为具有天然蛋白构象的活性蛋白。

本试剂盒中不含有 EDTA，与金属螯和层析等下游应用兼容。

自备试剂和仪器：

离心机、振荡器、Dounce 匀浆器、涡旋混匀器、移液器、冰箱、冰盒，PBS 缓冲液、蛋白定量试剂盒，离心管、吸头、一次性手套

使用方法：

一、使用注意事项：

1. 正式实验前请选取几个样本做预实验，以优化实验条件，取得最佳实验效果

2. 螺旋盖微量试剂管装的试剂在开盖前请短暂离心，将盖和管内壁上的液体离心至管底，避免开盖时试剂损失。

3. 实验过程中的所有试剂须预冷；所有器具须放-20℃冰箱预冷。整个过程须保持样品处于低温。

4. 蛋白酶抑制剂储存期间溶液如果出现沉淀，不影响使用，溶解后正常使用。

5. 最好使用标准 Dounce 匀浆器匀浆，如果没有 Dounce 匀浆器，用普通玻璃匀浆器也可以，但是蛋白回收率会下降。

6. 如果试剂盒不能短时间内用完，蛋白酶抑制剂混合物不可以一次全部加入提取液。

7. 可以根据自己实验需要加入其它蛋白酶抑制剂单品。

8. 下游实验如果是进行特定蛋白酶或磷酸酶的酶活性检测，提取液可以不加蛋白酶抑制剂或磷酸酶抑制剂，注意提取过程保持低温操作，缩短离心时间。

9. 禁止与其他品牌的试剂混用，否则会影响使用效果。

10. 样品或试剂被细菌或真菌污染或试剂交叉污染可能会导致错误的结果。

11. Western Blot 实验内参可以选用 beta-actin、GAPDH、Tubulin。

12. 离心力转速有相对离心力（RCF，×g）和每分钟转速（RPM）两种表示方式，有些离心机设置有 RPM 和×g 显示切换，但部分离心机没有自动切换功能。需要用到下面的公式进行换算：g=r×1.118×10 -5×rpm2（r 为有效离心半径，即从离心机轴心到离心收集管底部中心位置的长度，单位为厘米）。例如：转速为 3000rpm，有效离心半径为 10cm，则相对离心力（RCF，×g）为 10×1.118×10 -5×3000 2=1006.2（×g）。

二、操作步骤

细胞高尔基体提取：

1. 提取液准备：

每 500μl 冷的蛋白提取液 D 中加入 2μl 蛋白酶抑制剂混合物，混匀后置冰上备用。

【注】：根据需要处理的样品数量准备蛋白提取液，蛋白酶抑制剂混合物不可以一次全部加入提取液。

加过蛋白酶抑制剂的提取液一周内未使用完，再次使用前需要再次加入蛋白酶抑制剂。

2．取 1-2×10 7 个细胞，在 4℃，500×g 条件下离心 2-3 分钟，小心吸取培养基，尽可能吸干，收集细胞。

3．用冷 PBS 洗涤细胞两次，每次洗涤后尽可能吸干上清。

4．加入 400μl 冷的试剂 A，置冰上 10 分钟。

5．用 Dounce 匀浆器充分匀浆几分钟，然后在 4℃，1000×g 力条件下离心 5 分钟。

6．弃沉淀，将上清吸入另一预冷的干净离心管。

7．在 4℃，3000×g 离心力条件下离心 10 分钟。

8．弃沉淀，将上清吸入另一预冷的干净离心管。

9．在上清中加入 10μl 试剂 WT，在 4℃，20000×g 条件下离心 20 分钟。

10．弃上清，在沉淀中加入 500μl 冷的试剂 B，混匀。

11．在 4℃，20000×g 力条件下离心 30 分钟。弃上清，收集沉淀。

12．在沉淀中加入 100-300μl 蛋白提取液 D，吹打混匀后，在 4℃条件下振荡 15-20 分钟，至沉淀充分裂解，无明显沉淀。

【注】：使用振荡器/摇床的较低转速，提取液能轻微晃动即可。

没有振荡条件也可以不振荡，稍微延长提取液的处理时间，中间每隔几分钟用移液器吹打混匀即可。

13．在 4℃，12000×g 条件下离心 15 分钟。

14．将上清吸入另一预冷的干净离心管，即可得到高尔基体蛋白样品。

15．将上述蛋白提取物定量后分装于-80℃冰箱保存备用或直接用于下游实验。

【注】： 建议用 BCA 法进行蛋白定量。

蛋白样品-80℃存放一年没有问题。注意不要被蛋白酶水解掉，不要被细菌污染。

组织高尔基体提取：

1. 提取液准备：

每 500μl 冷的蛋白提取液 D 中加入 2μl 蛋白酶抑制剂混合物，混匀后置冰上备用。

【注】： 根据需要处理的样品数量准备蛋白提取液，蛋白酶抑制剂混合物不可以一次全部加入提取液。

加过蛋白酶抑制剂的提取液一周内未使用完，再次使用前需要再次加入蛋白酶抑制剂。

2. 取 50-100mg 新鲜动物组织样本，用 PBS 洗涤干净。

3. 用剪刀尽可能剪碎，用冷 PBS 洗涤两次。

4. 加入 400μl 冷的试剂 A，置冰上 10 分钟。

5. 用 Dounce 匀浆器充分匀浆几分钟，然后在 4℃，1000×g 力条件下离心 5 分钟。

6. 弃沉淀，将上清吸入另一预冷的干净离心管。

7. 在 4℃，3000×g 条件下离心 10 分钟。

8. 弃沉淀，将上清吸入另一预冷的干净离心管。

9. 在上清中加入 10μl 试剂 WT，在 4℃，20000×g 条件下离心 20 分钟。

10. 弃上清，在沉淀中加入 500μl 冷的试剂 B，混匀。

11. 在 4℃，20000×g 条件下离心 30 分钟。弃上清，收集沉淀。

12. 弃上清，沉淀用高尔基体保存液重悬。

13. 在沉淀中加入 100-300μl 蛋白提取液 D，吹打混匀后，在 4℃条件下振荡 15-20 分钟，至沉淀充分裂解，无明显沉淀。

【注】：使用振荡器/摇床的较低转速，提取液能轻微晃动即可。

没有振荡条件也可以不振荡，稍微延长提取液的处理时间，中间每隔几分钟用移液器吹打混匀即可。

14. 在 4℃，12000×g 条件下离心 15 分钟。

15. 将上清吸入另一预冷的干净离心管，即可得到高尔基体蛋白样品。

16. 将上述蛋白提取物定量后分装于-80℃冰箱保存备用或直接用于下游实验。

【注】：建议用 BCA 法进行蛋白定量。

蛋白样品-80℃存放一年没有问题。注意不要被蛋白酶水解掉，不要被细菌污染。

注：

1. 用什么方法定量蛋白？

建议用 BCA 法。不适合用 Bradford 法，因为试剂 A 中含有干扰 Bradford 法的组份，导致定量不准。如果已经进行过透析处理或者用脱盐柱改换过缓冲体系，则可以用 Bradford 法定量。

2. 提取的蛋白具有活性吗？

本试剂盒不含有离子型去垢剂组份，不破坏蛋白的结构，没有对蛋白质之间原有的相互作用的破坏，蛋白均保持其天然构象和活性。

注意事项：

1. 本试剂盒仅供科学研究使用，不可用于诊断或治疗。

2. 最好使用一次性吸头、管、瓶或玻璃器皿，可重复使用的玻璃器皿必须在使用前清洗并彻底清除残留清洁剂。

3. 实验后完成后所有样品及接触过的器皿应按照规定程序处理。

4. 避免皮肤或粘膜与试剂接触。