

## PAGE 胶蛋白微量回收试剂盒

**货号:** AC11931

**规格:** 20 Assays

**保存:** 所有试剂常温下运输, 收到后所有试剂 2-8℃ 保存, 溶液 B 避免火源, 溶液 A 在低温下容易形成沉淀, 请在使用前 30℃ 加热, 以促进溶解。

**产品组成:**

产品名称	规格
Buffer A	10ml
Buffer B	60ml
干粉	9.6g
DTT	40mg
过滤柱	20 个
收集管	20 个

使用前将干粉和 DTT 完全溶解于溶液 A 中, 配完后 4℃ 保存, 每次使用时 30℃ 加热, 以促进溶解, 混合好的溶液 A 尽量在一个月内使用完毕。

**产品说明:**

SDS-PAGE 不仅可用于检测蛋白质的相对分子质量, 而且也是分离纯化蛋白质的重要工具之一, 随着蛋白质技术的微量化, 有必要从凝胶中回收蛋白质以用于制备抗体、免疫印迹、氨基酸组分分析或末端序列测定等, 本产品就是专门为此用途开发的微量蛋白胶回收法, 本产品适用于从考染, 铜染或锌染中回收蛋白质, 回收效率在 50-80%, 能够使用 20 次。

**产品特点:**

1. 简单, 不需要复杂而昂贵的仪器 (如电洗脱仪)。
2. 适用于变性胶 (SDS-PAGE) 和非变性胶 (Native-PAGE)。
3. 回收率一般在 50-80% 之间 (跟蛋白质大小, 洗脱时间相关)。
4. 跟后续的实验兼容, 包括 1-D、2-D 电泳和质谱测序等。

**操作步骤:**

1. 用手术刀片将铜染或锌染的胶块中含有目的条带的部分胶切下, 放入 1.5mL 的离心管中, 用相应的消除液将胶中蛋白质条带脱色到胶体接近无色, 室温 12000 rpm (12830 g), 离心 5 min, 尽量去除上清, 保留胶体。

对于考染或其他考染方法, 直接将不需要脱色液脱色的或经过脱色液脱色的胶块中含有目的条带部分切下, 放入 1.5mL 的离心管中, 用双蒸水洗两次, 每次 5min, 再进行步骤 2。

2. 用研磨杆将离心管中的胶体研磨成细小的碎片, 加入 400μL 的溶液 A, 在室温条件下, 脱色摇床上震荡过夜 (16-18 小时), 期间取出, 偶尔震荡几次。

3. 用 1mL 的去尖吸头吸取混合物至过滤柱中 (将胶一起吸入, 溶液过多时可分次加入), 13, 000rpm

离心5分钟。将收集管中的滤出液转入新离心管中，加入2 mL 的预冷的溶液B，混匀，4℃放置30 min。

4. 室温 12000 rpm，离心 15 min，去除上清，再将离心管放置在通风厨中，待残留的液体挥发干净。也可以再次加入 0.5 mL 的溶液 B，震荡洗涤沉淀，4℃放置 15 min，再重复步骤 4 一到两次，这样得到的蛋白质更纯净。
5. 待液体挥发干净选用合适的缓冲液溶解沉淀的蛋白质，以方便进行后续的电泳和质谱测序等实验。

#### **注意事项：**

1. 在保证完全切取到目的蛋白质后，尽量去除多余的胶片。
2. 如果蛋白质的分子量较大，所加样的量较多，胶浓度比较大，可以适当延长温育时间。
3. 为了有比较好的回收效果，在进行胶中蛋白质回收时，每个点样孔中所加的蛋白质量最好在 2 $\mu$ g-40 $\mu$ g 之间。
4. 采用含有Urea、Thiourea、SB3-10 等强溶解能力试剂的溶解液有助于沉淀蛋白的完全溶解。
5. 研磨杆研磨碎片时，越充分越好，这样有利于蛋白质扩散到溶液A 中。
6. 采用此试剂盒进行胶回收时，一般不建议采用银染，因为此时回收效率较低。
7. 目的蛋白回收效率与蛋白的分子量大小有一定的关系，在10KD 以下的多肽回收效率明显降低，如果大于120KD，则需要增加步骤2中的震荡过夜时间。
8. 如果在制浓缩胶时不加梳子，将蛋白溶液均匀的铺在浓缩胶面上进行电泳，之后将整个胶块从左到右的一条完整的目的蛋白条带切下回收，则需要按照常规梳子上所带点样孔的数量，将所用试剂按照倍数增加。
9. 所加溶液A 和溶液B 的体积需要保持一定的比例关系，溶液B 的体积必须是溶液A 体积5 倍或5 倍以上，以避免在步骤3的过程中产生不必要的杂质沉淀。
10. 过程中所加试剂量是针对 80×60×1mm 凝胶而定，若体积较大，可适当增加各溶液的体积。