天净沙系列

CAT#:250504

低温运输，4℃保存

天净沙

磷蛋白富集试剂盒

Phosphoprotein Enrichment Kit

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品为磷蛋白富集试剂盒。本产品基于亲和原理，适用于从哺乳动物细胞和组织中提取磷酸化蛋白质。本产品具有以下特点：

1. 从细胞到样品纯化的平均时间少于 2 h，实验操作快速。
2. 操作简单直接，只需 4 步便可完成磷酸化蛋白质纯化。
3. 实验过程非变性，保证蛋白折叠构象。
4. 每个纯化柱的最多可结合约为 4 mg 磷酸化蛋白质。
5. 适用于质谱和 2D-PAGE 等多种下游应用。
6. 适用于任何类型的哺乳动物细胞，如 NIH 3T3，Cos-7 等。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用小扁盒包装

成分	编号	规格	包装
磷蛋白提取液	250504a	40 mL	60 mL 本色瓶
磷蛋白洗脱液	250504b	10 mL	10 mL 本色瓶
磷蛋白亲和柱	250504c	1 支	塑料袋
使用手册	250504sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，4℃保存，有效期一年。

自备物品

磷酸盐缓冲液（PBS）、蒸馏水、待测样本。

使用流程

1. 在预先称重的离心管中，用 20 倍体积的磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤 50-150 mg 细胞，以 500×g 的离心力离心 5 分钟，共洗涤三次。
2. 洗涤后，按上述条件再次离心细胞，然后倒出上清液并吸去残留液体。
3. 将离心管再次离心约 2 分钟，吸去任何残留的微量液体。然后重新称量离心管，以确定细胞沉淀的重量。
4. 将样品置于液氮中或-80℃冰箱中冷冻。
5. 将约 100 毫克的细胞沉淀重新悬浮于每毫克细胞 30 μL 的磷蛋白提取液中
6. 轻柔吹打约 20 次来混匀沉淀。
7. 在 4℃下孵育 10 min，期间每分钟倒转试管一次。将细胞裂解液转移至微量离心管中。
8. 将细胞提取物在 4℃下以 10000 ×g 离心 20 分钟。在离心样品的同时开始准备柱子。
9. 将上清液转移到干净的试管中，不要触碰到沉淀物。

	10. 将澄清样品的一部分保存在 4℃，用于蛋白质测定和其他分析。 11. 让柱子在室温下直立放置，直到树脂从悬浮液中沉淀出来。 12. 拆下柱顶盖，然后是端盖，让储存缓冲液排出，直至与树脂床顶部齐平。 13. 用 5 毫升蒸馏水冲洗柱子。 14. 加入 5 毫升磷蛋白提取液，使柱子达到平衡状态，并让缓冲液流过。 15. 重复第 14 步。 16. 收集并测量最后 2 毫升流出液的 pH 值。如果 pH 值不小于或等于 6.0，则继续用磷蛋白提取液冲洗。 17. 用端盖封闭柱子，将澄清后的样品加入柱子中。 18. 用顶盖封闭柱子。 19. 将装有样品的柱子置于平台振荡器上，于 4℃轻轻振荡 20 分钟，使磷酸化蛋白结合到柱子上。 20. 让柱子直立放置 5 min，使树脂沉降。 21. 拆下柱顶盖，然后拆下端盖，让未吸附的物质流出。如果需要分析非磷酸化蛋白，则收集这些未吸附的物质。 22. 通过加入 5 毫升磷蛋白提取液并让其流过，清洗柱子。重复此洗涤步骤三次，总共四次 5 毫升洗涤。 23. 加入 1 毫升磷蛋白洗脱液，并在冰上收集该部分。 24. 每次用 1 毫升磷蛋白洗脱液重复步骤 23 四次（每次收集部分）。立即将所有部分储存在冰上。 25. 进行 BCA 分析，以确定细胞提取物及洗脱部分中的蛋白质浓度。
关联产品	植质体富集试剂盒