

天
净
沙
系
列

CAT#:81029-10
常温运输、4℃保存

TIANDZ

非变性法蛋白沉淀试剂盒

Non-Denaturing Protein Precipitation Kit

使用手册 V1.0

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

产品及特点	本产品是基于蛋白质盐析和透析原理开发的非变性蛋白质浓缩产品。其原理是将大量具有很强水化能力的硫酸铵加到蛋白质溶液中，夺取蛋白质分子的水化层（尤其是蛋白质表面非极性区的水化层），使之“失水”，于是蛋白质分子间的非极性基团将互相结合，使蛋白质形成沉淀，离心分离沉淀后，再用透析方法将蛋白质中的盐除去，即得浓缩的蛋白质。本产品的特点如下： 1. 适合于浓缩各种蛋白质粗提液，一次可以处理 50 mL 蛋白质溶液。 2. 非变性法，不会破坏蛋白质的天然结构和活性，尤其是适用于对变性敏感的酶溶液。 3. 得到的蛋白质结构稳定，适合于长期保存。 4. 可以在透析是进行缓冲液的调换。 5. 一站式，带有盐析和透析所需的物品。				
规格及成分		成 份	编 号	10 次包装	
		溶液 A	81029A	50 mL×10	
		无菌水		50 mL	
		EDTA 溶液(0.5M)		0.5 mL	
		使用手册	81029sc	1 份	
运输及保存	常温运输和保存，有效期一年。				
自备试剂	透析液。				
使用方法	注意：除对温度敏感的蛋白质样品需在 4℃环境下（如冷室）操作外，一般可在室温中操作，操作者整个操作须戴好手套。 一：盐析沉淀 1、 测量待浓缩蛋白质样品的体积，并将其转移到容积至少是样品体积两到三倍的无菌烧杯或玻璃三角瓶中。注意：需要处理的蛋白质样品最好溶解在 pH 为中性的缓冲液中（如 50 mM 的 Tris-HCl），浓度最好在 1mg/mL 以上。 2、 将一个无菌的磁力搅拌子放入三角瓶中，再将三角瓶放置在磁力搅拌器上，打开开关后缓慢搅拌。注意：搅拌过程中不能产生泡沫。 3、 如果待浓缩蛋白容易被金属离子失活或抑制，则最好加入 EDTA 溶液，使其终浓度为 10 mM，否则此步可省略。				

	4、 根据所需硫酸铵的饱和度计算需要加入的溶液 A 的体积，溶液 A 的硫酸铵饱和度是 100%。一般 50%的硫酸铵饱和度就可以沉淀绝大部分蛋白，超过此饱和度溶液比重很大，难以通过离心收集蛋白质沉淀。 5、 小心缓慢加入所需的溶液 A（用前需要摇匀）。注意：最好每次少量加入，切莫一下倒入，否则蛋白质容易变性。混合过程中，蛋白质沉淀可能会使溶液呈牛奶状，属于正常现象。 6、 将所需溶液 A 全部加入后，冰上放置 60 分钟或过夜让蛋白质充分沉淀。注意：血红蛋白、肌红蛋白和清蛋白等在较高的温度 25℃比在 0℃度时溶解度低，更容易盐析，所以浓缩这些样品时冰浴放置可以改为室温放置。有的蛋白质 15-20 分钟就可以完全沉淀，有的则需要数小时。 7、 将溶液轻移到旋盖塑料离心管或离心瓶中，在平衡条件下 15000×g 4℃离心 15 分钟。注意：溶液比重很大，一定要重量上平衡而非体积平衡。 8、 小心弃上清，得到蛋白质沉淀。此沉淀可以在 4℃放置数月。 9、 将尽可能少的无菌水或其他缓冲液加入蛋白质沉淀中使之溶解，所加体积一般是沉淀物体积的 1-2 倍。如果沉淀溶解后非常粘稠，可以适当补加无菌水使其变得不粘稠。此沉淀可以在 4℃放置几天。 10、如果溶液中有不溶物（主要是变性的蛋白质），可以 15000×g 4℃离心 15 分钟，留上清。 11、上清液可以用于 SDS-PAGE 电泳检测或 UV 法蛋白质浓度测定。 12、如果后续纯化方法是疏水层析或排阻层析，则不需要将溶液中残留的盐去掉，可以直接使用。如果后续纯化是离子交换层析，则需要将溶液中残留的盐去掉，一般采用透析法，具体操作见附一。 附一：透析脱盐 1、 将蛋白溶液转移到一端已经封口的透析袋内，预留一些液体膨胀的空间，然后将另一端封口。注意：用户需要预处理透析袋，预处理的方法是将透析袋在含 2%（W/V）碳酸氢钠和 1 mM EDTA 的溶液中煮沸 10 分钟，用蒸馏水彻底清洗透析袋，然后放在 1 mM EDTA 的溶液中煮沸 10 分钟并浸没在此溶液中冷却，最后放 4℃保存待用。取用时必须要戴手套。 2、 将透析袋放置在装有透析液的容器中，透析液的体积必须是蛋白质溶液
--	--

	的 20-100 倍，溶液最好处于搅拌状态。用户可以用适合后续实验的任何缓冲液作为透析液。每次透析 3-4 小时，共透析 2-3 次。可以用自备的茚氏试剂检测透析袋外面溶液是否还有残留的铵离子来检测透析是否完成。 3、 将透析后的溶液全部转移到离心管中，15000×g 4℃离心 15 分钟，上清液即为浓缩后的蛋白溶液。可以放-80℃冰箱保存或立即用于后续的实验。 4、 如果需要快速测定蛋白质的浓度，可取少许样品作适当倍数稀释后，用紫外分光光计测 280nm 和 260nm 的光吸收，再计算其浓度，计算公式为：蛋白浓度(mg/mL)=(1.45×OD280-0.74×OD260)×样品稀释度。 附二：多克隆抗体的浓缩 1、 将待处理的血清样品在 4℃或室温 20000×g 离心 30 分钟，收集上清。 2、 取上清 20mL 与等体积的自备生理盐水混合后，于搅拌下缓慢滴加 40 mL 溶液 A。注意：加等量生理盐水的目的是将蛋白质含量降低到 2.5-3.0%，否则其他蛋白质会跟抗体一起共沉淀。 3、 冰上放置 30 分钟以上或过夜，使蛋白质充分沉淀。 4、 将溶液转移到旋盖塑料离心管中，15000×g 4℃离心 10 分钟，弃上清。 5、 用 12 mL 自备生理盐水溶解蛋白质沉淀。 6、 于搅拌下缓慢滴加 8 mL 溶液 A，冰上放置 1 小时使蛋白充分沉淀。 7、 将溶液转移到旋盖塑料离心管中，15000×g 4℃离心 10 分钟，弃上清。 8、 用 13.3 mL 生理盐水溶解蛋白质沉淀。 9、 于搅拌下缓慢滴加 6.6 mL 溶液 A，冰上放置 1 小时使蛋白充分沉淀。 10、将溶液轻移到旋盖塑料离心管中，15000×g 4℃离心 10 分钟，弃上清。 11、用少许生理盐水溶解蛋白质沉淀，并转移到透析袋中。 12、用大于 20-100 倍体积的 PBS 于 4℃对蛋白质溶液进行透析，更换透析液数次，然后让蛋白质溶液置-80℃保存或用其他方法进一步纯化。
关联产品	变性法蛋白质浓缩试剂盒