

# BPP 法变性蛋白提取实验方案

## 溶液和试剂

### BPP 裂解液配方

200mM Tris-Base,

200mM NaCl,

50mM 抗坏血酸钠,

1% 脱氧胆酸盐

1% NP-40,

1% Triton X- 100,

1% 吐温-20,

5mM EDTA,

30% 蔗糖

50mM 四硼酸钠

1% PVPP

**BPP 裂解液使用前需加蛋白酶抑制剂。(一定要添加, 推荐 cocktail 形式的, 货号 A10004)**

饱和硫酸铵甲醇溶液 向 500ml 甲醇中添加 20g 的硫酸铵, 看到有晶体析出即可

Tris 饱和酚 Solarbio (厂家)

## 实验步骤

- 1) 将样品放入预冷的研钵中进行研磨, 期间不断加入液氮保持低温, 动物样本反复研磨的总时长大约 10 分钟, 植物样本反复研磨的总时长大约 20 分钟。研磨结束后, 将样品装管。
- 2) 首次处理的样本按照下表中样品质量 (g): 提取液体积 (mL) =1:5 的比例加入 BPP 裂解液。已做过预实验的样本, 裂解液的添加比例可以参照预实验的结果。
- 3) 如果加入裂解液后溶液呈半透明状水样, 不粘稠, 说明裂解液的比例合适, 若溶液呈现样品的颜色 (与研磨后粉末颜色相近) 或者特别粘稠 (漩涡震荡仪无法重悬液体), 说明裂解液比例不合适, 需要再添加裂解液; 若裂解液比例达到 1:10, 溶液的颜色仍然没有改变, 确认方法是否合适, 同时检查裂解液的配制是否有问题。



图 1

- 4) 置于漩涡震荡仪上震荡, 至少 5 分钟, 保证样品粉末在 BPP 裂解液中充分混匀, 即肉眼观察无大于 0.2cm<sup>2</sup> 的块状固体, 标准如图 2a; 充分混匀后镜检标准如图 2b。若超过 5 分钟

后仍有块状固体未溶解（如图 2c），需要镜检确定是否充分混匀

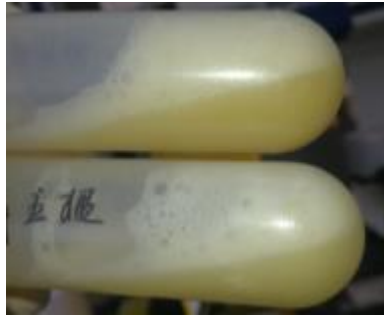


图 2a 充分混匀后状态图



图 2b 3 个随机视野镜检图

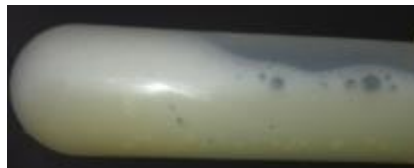


图 2c 震荡后仍有块状固体图

- 5) 将混匀后的样品，放在 4℃ 冰箱的垂直混匀仪上孵育裂解 2 个小时。
- 6) 孵育完成后，进行超声裂解，将超声仪的变幅杆插入样品溶液距离管底的 1/3 处，变幅杆不得倚靠管壁或者管底，呈悬空状态超声 3 秒~5 秒，然后停顿 10 秒~20 秒。超声时需要确保没有气泡，一旦产生气泡，需要立即停止并延长停顿时间，待气泡完全消去后，再进行超声，如此反复超声 30 次。
- 7) 配平，12500rpm，高速冷冻离心机，4℃ 离心 30 分钟。
- 8) 离心后的样品放至通风橱中，用移液枪缓缓吸取上清，转移至另一个干净的 50mL 圆底离心管中。原离心管中的沉淀需要保留，并暂存于 4℃ 冰箱中，待实验成功后，再行丢弃。
- 9) 在放入上清的 50mL 圆底离心管中，加入等体积的 Tris-饱和酚，盖上管盖混匀，将样品放入高速冷冻离心机中，12500rpm，4℃，离心 15 分钟。
- 10) 将离心后的蛋白样品，从高速冷冻离心机中取出，取出上清，转移到另一个干净的 50mL 圆底离心管中。在放有上清的 50mL 圆底离心管中，加入等体积的 BPP 裂解液，盖上管盖混匀，将样品放入高速冷冻离心机中 12500rpm，4℃，离心 15 分钟。
- 11) 将离心后的蛋白样品，从高速冷冻离心机中取出，放至通风橱取出上清，转移到干净的 50mL 锥底离心管或 500mL 塑料瓶中。此上清为蛋白粗提液。加入约 5 倍体积的饱和硫酸铵甲醇溶液于 50mL 离心管或 500mL 塑料瓶中，盖上瓶盖，上下颠倒混匀 30 次，将蛋白粗提液置于 -20℃ 冰箱中，过夜沉淀。
- 12) 将沉淀过夜后的蛋白粗提液，用移液枪分装到 50mL 圆底离心管中，每管的体积不得超

过 35mL。配平后放入高速冷冻离心机中，12500rpm，4℃，离心 30 分钟。

13) 将离心后的蛋白粗提液，从高速冷冻离心机中取出，平缓移动，防止沉淀悬浮。放至通风橱中，将上清缓缓倒掉，确保沉淀不滑落，然后用移液枪将管内残留的溶液吸去并丢弃。

14) 将步骤 13) 得到的沉淀，转移至 2mL 离心管中。用移液枪取 1.5mL 甲醇溶液加入其中，再用移液枪将沉淀吹散成颗粒状（如图 3）。然后将 2mL 离心管放入高速冷冻离心机中，12500rpm，4℃，离心 10 分钟。



图 3 平视图和俯视图

15) 将 2mL 离心管，从高速冷冻离心机中取出，放至通风橱中，将上清缓缓倒掉，确保沉淀不滑落，然后用移液枪将管内残留的溶液吸去并丢弃。

16) 用移液枪取 1.5mL 丙酮溶液加入到上一步 15) 得到的含有沉淀的 2mL 离心管中，用移液器将沉淀吹散成颗粒状，如图 5。将离心管放入高速冷冻离心机中，12500rpm，4℃，离心 10 分钟。

17) 将离心后的含有沉淀的 1.5mL 离心管，从高速冷冻离心机中取出。放至通风橱中，将上清缓缓倒掉，确保沉淀不滑落。然后用移液器将管内残留的溶液吸去并丢弃。将含有沉淀的 1.5mL 离心管开盖通风 2 分钟。期间确认无肉眼可见的丙酮溶液，且沉淀不能完全干透。通风 2 分钟后，立即盖上管盖。

18) 蛋白复溶，将通风后的蛋白沉淀加入适量 0.5% SDS。在 0.5% SDS 溶液中，用移液枪反复吹打沉淀，将沉淀吹散，使其最终均匀的分布在 0.5% SDS 溶液中（如图 4）。若蛋白仍不能完全溶解，则需要进行超声促溶。12500rpm 离心 10 分钟，弃去沉淀，转移上清至另一个管中，此上清即为蛋白原液。



图 4a

图 4b