

水稻总蛋白抽提

Total Protein Extraction from Rice

陈香嵩, 程赛凤, 周少立, 赵毓*

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: zhaoyu@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 陈香嵩, 程赛凤, 周少立, 赵毓. (2018). 水稻总蛋白抽提. *Bio-101* e1010120. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010120.

How to cite: Chen, X. S., Cheng, S. F., Zhou, S. L. and Zhao, Y. (2018). Total protein extraction from rice. *Bio-101* e1010120. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010120. (in Chinese)

简要原理: 以去污剂和盐离子破坏膜结构, 释放出总蛋白。本方法操作简单, 且蛋白抽提彻底。

关键词: 总蛋白, 水稻, 粗提

材料与试剂

1. 1.5 ml 离心管
2. 各种型号枪头 (20 μ l, 200 μ l, 1 ml)
3. 液氮
4. 1 M Tris-HCl (固体 Tris 碱配制, 浓盐酸调节 pH)
5. SDS
6. 甘油
7. β -巯基乙醇
8. 溴酚蓝
9. 5 M NaCl (固体配制, 国药集团)
10. Triton X-100 (上海生工分装进口试剂)
11. Protease Inhibitor (Roche, catalog number: 11836153001)
12. 总蛋白抽提缓冲液 (见溶液配方)
13. 4x Laemmli buffer (见溶液配方)

仪器设备

1. 移液枪 (20 μ l, 200 μ l, 1 ml)
2. 天平
3. 高速冷冻离心机
4. 研钵

实验步骤

1. 取 200 μ l 总蛋白抽提缓冲液加入到 1.5 ml 离心管中，放在冰上待用。
2. 液氮研磨水稻叶片，取大约 0.1 g 粉末，加入到 200 μ l 缓冲液中，充分混匀。
3. 12,000 rpm 冷冻离心 10 分钟。
4. 取上清，以 3:1 加入 4x Laemmli buffer，混匀后 95 度以上变性 10 分钟,冰上冷却 5 分钟。
5. 室温 12,000 rpm 5 分钟，取上清进行 SDS-PAGE 检测。

注：本方法操作简单且蛋白抽提彻底，但是电泳过程中杂质较多，大分子量蛋白条带不清晰。

6. 本实验方法可简化为：

将用液氮磨好的粉末以 0.1 g/200 μ l 的比例直接加入到 1x Laemmli buffer 中，混匀后 95 度以上变性 10 分钟，离心取上清即为变性后的总蛋白，可直接用于 SDS-PAGE 检测。

溶液配方

1. 4x Laemmli buffer

配方	80 ml 用量
250 mM Tris-HCl (pH 6.8)	20 ml 1M
8% SDS	6.4 g
40% 甘油	32 ml
4% β -巯基乙醇	3.2 ml
0.01% 溴酚蓝	0.008 g

注：溴酚蓝可不必称量，边加边观察颜色变化，适量即可，过多会导致颜色偏红。

2. 总蛋白抽提缓冲液

配方	10 ml 用量
50 mM Tris-HCl (pH 7.5)	500 μ l 1 M
150 mM NaCl	300 μ l 5 M (国药)
0.5% Triton X-100	250 μ l 20% (上海生工)
Protease Inhibitor (Roche)	200 μ l (1 粒药丸溶解于 1ml 双蒸水中)

注: 若抽提出的总蛋白直接用于 SDS-PAGE 检测, 可以用 SDS 代替 Triton X-100, 由于 SDS 的变性能力比 Triton X-100 强, 可以更好的将核内的蛋白也抽提出; 如提取的总蛋白是用于蛋白或复合体的分离纯化, 则不能使用 SDS。