蛋白提取：

DNA是从RNA抽提之后的中间相以及酚仿层获得的。

1．移除任何可见的水相层，对于抽提DNA的纯度非常重要。

2. 每1ml Trizol原液加入0.3ml无水乙醇。（note，按照比例进行添加，每100μ原液加入30μ。note2：按照分子生物学，trizol去除RNA抽提的50%水相，1ml剩下500μ有机相，加入300μ无水乙醇大致浓度66%左右，适合核酸类物质的沉淀）

3. 上下颠倒数次进行混匀，并室温孵育2-3min。

4.  2000G 4℃5min离心，进行DNA沉淀。

6. Remove the phenol-ethanol supernatant and save it in a new tube if protein isolation is desired. The supernatant can be stored at –70°C for several months.

上清液中含有蛋白，如果有需要则进行收集。（重点）可以在-70℃冻存数月。

7. DNA沉淀进行DNA清洗步骤。（同RNA，不赘述）

**DNA抽提后酚醇层抽提蛋白**

使用沉淀法（以下）或透析法

1. 每1mlTrizol原液添加1.5ml异丙醇。

2. 室温孵育10min。

3. 12000G4℃10min离心进行蛋白沉淀。弃去上清。

4.按照以下步骤进行蛋白质清洗。

1) 将0.3M盐酸胍溶于95%酒精中，配置为蛋白清洗液。

2) 每1mlTrizol原液添加2ml清洗液。

3) 室温孵育20min。（note：蛋白可于蛋白清洗液中于4℃保存至少一月，或于-20℃保存至少一年。

4) 7500G 4℃ 5min离心，移除清洗液。

5) 重复2-4两次。（note，共洗涤3次）

6) 第三次清洗完成后，加入2ml100%乙醇，涡旋震荡。

7) 室温孵育20min。

8) 7500G4℃5min离心，移除乙醇清洗液。

9) 自然风干蛋白5-10min。请勿过度干燥（同核酸，过度干燥将导致溶解困难）

5. 再溶解

1)  加入1%SDS进行蛋白质溶解（推荐量200μ，note，根据自己蛋白的浓度请进行调整，note2，如果为进行蛋白浓度测定，能否加入10μ左右进行高浓度溶解？）note：为了完全溶解，可能需要在50℃进行孵育，需要使用水浴锅。

2) 10000G4℃10min，以去除任何不溶性沉淀。

3) 将所得上清液转移至新的离心管在-20℃进行保存或直接进行下游操作。

**\* 透析法**

蛋白清洗之后的沉淀，因为蛋白质的不溶可能会难以溶解，如果蛋白在SDS溶液中无法溶解，请按照以下步骤进行操作（简单来说就是透析法）：

• 1% SDS and 62.5 mM sarkosyl at pH 8.0–8.8

• 9.5 M urea and 2% CHAPS, pH 9.1

• 250mM glycerol, 10mM TEA, and 4% CHAPS

• 2% diethylamine

• 10M Urea Protein dialysis

1. 将原始步骤中的酚醇液直接装入透析袋中。note：溶液可能腐蚀透析袋，请提前进行测试。（因本人没进行过透析，以下不进行翻译了）

2. Dialyze the sample against 3 changes of 0.1% SDS at 4°C. Make the first change of solution after 16 hours, the second change 4 hours later (at 20 hours), and the final change 2 hours later (at 22 hours). Note: 0.1% SDS is required to resolubilize the proteins from the pellet; a lower concentration of SDS is insufficient. If desired, the SDS can be diluted after solubilization.

3. Centrifuge the dialysate at 10,000 × g for 10 minutes at 4°C. Proteins are located in the clear supernatant.

4. Transfer supernatant to a new tube and proceed to downstream application, or store the sample at –20°C.

5. (Optional) Solubilize the pellet by adding 100 μL of 1% SDS and 100 μL of 8 M urea