拟南芥总蛋白简易提取

**前言**

植物蛋白提取一般遵循如下基本原则：尽可能提高样品蛋白的溶解度，抽提最大量的总蛋白，减少蛋白质的损失；减少对蛋白质的人为修饰；破坏蛋白与其他生物大分子的相互作用，并使蛋白质处于完全变性状态。

**试剂**

1. 2×SDS loading buffer without loading dye (200mL)

|  |  |
| --- | --- |
| 1mol/L Tris-HCl, pH6.8 | 20mL |
| SDS | 8g |
| β-ME | 2.86mL |
| 甘油 | 40mL |

1. 1mol/L Tris-HCl pH6.8 (100mL)

|  |  |
| --- | --- |
| Tris 碱 | 12.11g |
| 用浓HCl调pH至6.8后加水至100mL | |

1. 2×SDS loading buffer with dye（100mL）

|  |  |
| --- | --- |
| 1mol/L Tris-HCl pH6.8 | 10mL |
| SDS | 4g |
| β-ME | 1.43mL |
| 甘油 | 20mL |
| 溴酚蓝 | 0.2g |

1. 80%丙酮（200mL）

**方法步骤**

1. 取目的材料加入液氮中研磨。
2. 加入2×SDS loading buffer without loading dye 260μL，混匀。
3. 在沸水浴5~10 min (加热灭活蛋白酶)。
4. 18000g，10min 离心。
5. 取200μL上清于一新的离心管中，弃沉淀。
6. 向新离心管中加入800μL 4℃预冷的100%的丙酮，在-20℃保存30min以上。
7. 18000g离心10min，弃上清。
8. 加80%的丙酮洗沉淀1~2遍 （清洗时打散沉淀）。
9. 将离心管在空气中晾干（不能过度干燥，过度干燥会导致大量蛋白不溶解）。
10. 加入50~100μL 1×SDS loading buffer with dye（如要进行蛋白定量，则应加入50~100μL 1×SDS loading buffer without dye）。
11. -80℃中保存。

**说明**

* 1. 研磨过程中要将离心管放回在液氮中以维持管中温度，防止材料融化后降解；
  2. 沸水浴时不要盖水浴锅锅盖，以免离心管盖子炸开；
  3. 离心后取上清时尽量不要接触到管底的沉淀；