

**上海生物样本库**  
**最佳实践规范及标准操作流程**  
**文件汇编**  
**(第二版)**

2010年5月

<b>上海生物样本库</b>				
质量管理体系文件				
文件名称	组织蛋白质提取操作规程		编号	SOP-SC-059-01
批准人		批准日期	实施日期	

## 组织蛋白质提取操作规程

### 1. 目的

规定从组织中提取蛋白质实验应遵守的操作。

### 2. 适用范围

使用与从组织中提取蛋白质的操作。

### 3. 定义和术语

无

### 4. 职责

4.1 样本库实验技术员负责从组织中提取蛋白质。

### 5. 设备和器材

见正文内容

### 6. 正文

#### 6.1 SDS提取丙酮沉淀的方法提取蛋白质

6.1.1 将组织置于盛有液氮的组织研磨器内，研磨将组织粉碎。

6.1.2 待液氮挥发，每 1g 组织加入约 5ml 裂解液（0.175M Tris-HCl pH8.8，5% SDS，15%，0.3M DTT）。摇晃 30 秒至混匀。

6.1.3 使组织粉末完全分散于裂解液中后将悬液通过两层虑布（miracloth）转移至 50ml 离心管中。

6.1.4 立即加入 4 倍体积的无水丙醇，混匀后在 -20℃ 放置至少 1 小时沉淀蛋白质。

6.1.5 5000g 离心 15 分钟收集沉淀的蛋白质，倾去上清。

6.1.6 小心倒尽剩余的丙酮，用冰冷的 80% 丙酮清洗沉淀。用枪头打碎沉淀

并混匀。

6.1.7 用 80%丙酮重复 6.2.5 和 6.2.6 的步骤洗涤蛋白质沉淀。

6.1.8 5000g 离心 15 分钟收集沉淀的蛋白质，在 37℃ 下将离心管倒置 15 分钟干燥沉淀并保存。

## 6.2 苯酚提取甲醇醋酸铵的方法提取蛋白质

6.2.1 将组织置于盛有液氮的组织研磨器内，研磨将组织粉碎。

6.2.2 待液氮挥发，每 1g 组织加入 2.5ml pH8.8 含有 Tris 缓冲液的苯酚裂解液（0.1M Tris-HCl pH8.8，10mM EDTA，0.4%二巯基乙醇，0.9M 蔗糖），在通风橱中混匀 30 秒。转移至 15/50ml 离心管中，均质器中均质 1 分钟。

6.2.3 转移至新的离心管中，4℃ 搅动 30 分钟。

6.2.4 在 4℃ 下 5000g 离心 10 分钟。

6.2.5 分出酚相（加入蔗糖的情况下酚相在上层，否则反之），剩余部分倒入新的离心管中。

6.2.6 加入同体积新鲜配制的含有 Tris 缓冲液的苯酚裂解液，重复 6.2.3 和 6.2.4 的步骤。加收集的酚相与 6.2.5 中的酚相混合。

6.2.7 在混合的酚相中加入等体积新鲜配制的 Tris-EDTA 蔗糖蛋白质提取液。重复 6.2.3 至 6.2.5 的步骤。

6.2.8 在收集的酚相中加入 5-10 倍体积的 0.1M 无水甲醇醋酸铵（-80℃ 保存）沉淀蛋白质。

6.2.9 涡旋，在 -80℃ 放置至少 2 小时。

6.2.10 在 4℃ 4000g 离心 30 分钟收集沉淀。

6.2.11 用 2x 冰冷 0.1M 甲醇醋酸钠和 2x 冰冷 80%丙酮配制的 10mM DTT。

6.2.12 真空干燥蛋白质沉淀并保存。

## 7. 相关文件

《蛋白质提取控制程序》 SOP-SC-031-01

## 8. 参考标准与文献

Protein extraction from whole tissues for isoelectric focusing,  
University of Missouri - Columbia Proteomics Center