

上清蛋白提取

1. 样本处理

1.1 4 °C, 300 g × 5 min 离心去除细胞及碎片

2. 沉淀

2.1 加入与细胞培养上清液等体积的无水甲醇和1/4体积的氯仿, 用力震荡1 min, 4 °C 静置10 min

2.2 12000 g × 5 min, 4 °C 离心

3. 去上清

3.1 离心后丢弃上清, 加入500 μL 无水甲醇, 涡旋10 s

3.2 12000 g × 10 min, 4 °C 离心

4. 洗涤

4.1 倒置离心管在滤纸上沥干或真空干燥10-15 min, 去除残余溶剂

5. 干燥

6. 溶解

5.1 按原细胞培养上清液体积的1/25加入2 × SDS loading buffer 重溶蛋白质沉淀

常见问题解析

1. 蛋白沉淀少或看不见怎么办？

①样本上清液中蛋白质过低，建议冻干浓缩后再提取；②检查无水甲醇与氯仿质量（建议使用HPLC级），确保无水甲醇和氯仿的体积比正确；③优化孵育条件：将冰浴或-4°C的时间延长至30 min。如果效果仍不明显，可-20°C，孵育至少30 min，或过夜；④优化离心参数：提高离心转速和延长离心时间，可4°C离心，13000 g×10 min；⑤所有有机溶剂预冷至4°C，降低蛋白变性风险。

2. 蛋白质沉淀难以溶解怎么办？

①干燥不宜过度，干燥至"湿润块状"即可；②必要时用超声仪辅助溶解（功率200 W，超声3-5次，每次10 s，避免过热变性）。

3. 相分离时分层不明显，为什么？

①甲醇与氯仿比例错误，氯仿不足；②离心转速和时间不足：优化离心参数，增加离心转速和离心时间，可4°C，15000 g×10 min，促进分层。

参考文献

- [1]Puopolo T, Navindra PS, and Chang L. Chloroform/Methanol Protein Extraction and In-Solution Trypsin Digestion Protocol for Bottom-up Proteomics Analysis [J]. Bio-Protocol 2024,14 (16): e5055.
- [2]Shahinuzzaman, ADA., Jayanta KC, Zi XF, et al. Improved In-Solution Trypsin Digestion Method for Methanol-Chloroform Precipitated Cellular Proteomics Sample [J]. Journal of Separation Science, 2020, 43 (11): 2125–2132.
- [3]Jakobs C, Bartok E, Kubarenko A, et al. Immunoblotting for Active Caspase-1 [J]. Methods in Molecular Biology, 2013:1040:103-115.