

کیت استخراج پروتئین تام از گیاه

Plant total protein extraction kit

(Cat-No: SK1207-50 )

کاربردهای کیت: این بافر استخراج مناسب برای تهیه نمونه جهت وسترن بلات، ELISA، SDS-PAGE، Dot blot، تخلیص پروتئین و سنجش های آنزیمی می باشد.

(ب) محتویات کیت

| نام ماده                               | مقدار | توضیحات                        |
|----------------------------------------|-------|--------------------------------|
| ۱ بافر RIPA                            | ۵۰ ml |                                |
| ۲ کوکتل مهار کننده پروتئیناز ۱ (۱۰۰ X) | ۱ ml  | در یک میلی لیتر DMSO حل شود    |
| ۲ کوکتل مهار کننده پروتئیناز ۲ (۱۰۰ X) | ۱ ml  | در یک میلی لیتر آب مقطر حل شود |

الف) مقدمه

به طور کلی روشهای مختلفی برای استخراج و خالص سازی پروتئین ها وجود دارد. این روشها شامل روش های زیستی مانند تخریب سلولها توسط آنزیمهایی مانند لیزوزیم، روشهای شیمیایی مانند استفاده از شوینده های مختلف و روشهای مکانیکی مانند سونیکاسیون، هموژناسیون، فریز کردن و ذوب کردن، له کردن در نیتروژن مایع و تخریب با استفاده از دانه های شیشه ای هستند. هیچ کدام از روشهای فوق، روش مناسب و عمومی و ایده آلی برای لیز سلول و استخراج پروتئین در همه شرایط نمی باشد. عواملی مانند خصوصیات فیزیکی و شیمیایی پروتئین و نوع میزبانی که این پروتئین را تولید می کند و حتی هدف پژوهش، نوع روش لیز سلولی برای استخراج پروتئین را تعیین میکنند.

**بافر استخراج پروتئین تام** از بافت های گیاهی یک محلول کامل شامل دترجنت های یونی و غیر یونی است که قادر به لیز و محلول سازی طیف وسیعی از پروتئین ها از انواع سلولهای چسبنده، سوسپانسیون و انواع بافت های گیاهی می باشد. علاوه بر این، بافر استخراج پروتئین تام میانکنش های غیر اختصاصی بین پروتئین ها را به حداقل رسانده و با حفظ میانکنش های اختصاصی، امکان مطالعه میانکنشهای پروتئین- پروتئین را فراهم می آورد. پروتئین های استخراج شده با بافر استخراج پروتئین برای انواع روش های الایزا، SDS-PAGE، وسترن بلات، رسوبدهی ایمنی و سنجش آنزیمی سازگار است.

این بافر حاوی انواع مهارکننده های پروتئیناز و فسفاتازی می باشد. بافر استخراج پروتئین حاضر بصورت 1X و آماده مصرف می باشد. اما برخی از مهار کننده های آن بصورت کوکتل 100X در کیت گنجانده شده است که قبل از مصرف در یک میلی لیتر حلال مشخص شده حل شود و ۱۰ میکرولیتر از آن به یک میلی لیتر بافر استخراج پروتئین کل افزوده شود.

نگهداری کیت

بافر استخراج پروتئین و کوکتل های مهار کننده بایستی در کمتر یا مساوی ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شود. این بافر به مدت ۲-۳ هفته در ۴°C و به مدت شش ماه در ۲۰°C پایدار است. بهتر است بافر و کوکتل ها الیکوت شده و از فریز و دفریز به صورت مکرر خودداری گردد. در صورت نگهداری بافر در شرایط مناسب، بافر تا یک سال پایدار می باشد.

ج) روش کار

تمام مراحل استخراج پروتئین باید بر روی یخ انجام گیرد.

۱- لیز کردن نمونه گیاهی

ابتدا با اضافه کردن چندین بار نیتروژن مایع به هاون چینی، سعی شود دمای هاون چینی به حداقل ممکن برسد. نمونه های گیاهی (بافت های مختلف) به میزان ۰/۲ گرم را در هاون چینی در حضور نیتروژن مایع پودر نمایید. عمل پودر کردن نمونه ها را تا زمانیکه رنگ نمونه های پودر شده مایل به سفید شود ادامه دهید. سپس نمونه های پودر شده در میکروتیوب های ۱/۵ ریخته شود (میکروتیوب ها از قبل در ۲۰- گذاشته شود).



## ۲- استخراج پروتئین

- ۱- به هر کدام از میکروتیوب های حاوی نمونه های پودر شده، به میزان ۱ میلی لیتر بافر استخراج پروتئین اضافه گردد و بر روی یخ گذاشته شود.
- ۲- میکروتیوب های حاوی نمونه های پودر شده به صورت متناوب (۳۰ ثانیه ورتکس- ۳۰ ثانیه قرار دادن روی یخ) مجموعاً ۱۰ دقیقه یا ۱۰ بار ورتکس کنید.
- ۳- میکروتیوب های حاوی نمونه های گیاهی به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتیفریوژ شود. محلول رویی را برداشته و در میکروتیوب جدید قرار دهید.
- ۴- سپس مجدداً میکروتیوب ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm در ۴ درجه سانتی گراد سانتیفریوژ گردد.
- ۵- محلول رویی را برداشته و پس از الیکوت کردن تا زمان استفاده برای آنالیزهای پروتئینی از جمله سنجش غلظت پروتئین و WB در  $80^{\circ}\text{C}$  نگهداری گردد. از فریز/دفریز مکرر نمونه ها جداً باید خودداری گردد.

نکته: برای اطمینان از استخراج پروتئین، پس از تعیین غلظت پروتئین کل به روش برادفورد (SK1144) یا لوری (SK1145)، الگوی آن را بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲٪ مشاهده کنید.

در صورت بروز هر گونه ابهام، مشکل یا اشتباه با کارشناس پشتیبانی فنی آرسام فرا زیست در میان بگذارید. کارشناسان ما با شماره تلفن ۰۹۱۴۷۱۵۷۴۷۱ از طریق تلگرام و واتساپ و یا ایمیل [ArsamFaraZist@gmail.com](mailto:ArsamFaraZist@gmail.com) برای ارائه راهنمایی و رفع مشکل حاضر هستند.