**蛋白提取**

准备：

1、RIPA buffer / Lysis buffer（4℃）、PMSF（-20℃）、酶2（-20℃，可选）、酶3（-20℃，可选），转子（或者：研磨管/1.5ml离心管、研磨珠、研磨仪），泡沫盒（装冰），枪、枪头，离心机，1.5ml离心管等。

裂解液配制比例：100uL RIPA + 2uL PMSF（1-2ul 均可）+蛋白酶抑制剂等

2、组织蛋白提取：**全过程在低温环境中（冰上）进行**

* A、根据样品数量计算并制备所需裂解液。（后续步骤中 B、C 二选一）
* B、使用转子研磨：称取30mg组织置于1.5ml离心管，加入300uL裂解液（10mg/100ul），用转子搅碎组织）。
* C、使用研磨仪研磨：（研磨仪置物板- 20℃ 中预冷，）称取30mg组织置于研磨仪专用研磨管，预先做好标记并加入3颗研磨磁珠，加入300uL裂解液（10mg/100ul），放入预冷后的置物板中，将置物板固定在研磨仪上，以设定程序（频率：30；时间：5min）粉碎组织。
* D、研磨后于放置30min-1h，使充分裂解。
* E、待充分裂解后，将1.5ml离心管/研磨管于4℃、12000g、10-30min离心，吸取上清液转移至做好标记的新1.5mL离心管。（注意沉淀所在部位，勿吸取沉淀。）

3、细胞蛋白提取（6孔板）：**全过程在低温环境中（冰上）进行**

* A、根据样品数量计算并制备所需裂解液（Lysis buffer / RIPA）。
* B、取出6孔板，冷PBS洗一次，弃PBS。
* C、加入裂解液 150-250ul/孔，用200ul枪头帽“研磨”，研磨后静置20-30min使之充分裂解。
* D、分别吸取6孔板中液体至1.5ml离心管中，12000rpm、5-10min离心。
* E、取离心后上清于新的1.5ml离心管中，（做好标记。）
* F、测蛋白浓度，依据浓度加入原裂解液（Lysis buffer / RIPA）及5X loading buffer使个样本浓度一致，100℃煮5-10min。
* G、分装、保存（-20℃或-80℃）。