

细胞跨膜蛋白提取试剂盒

货号: EX1460

规格: 50T/100T

有效期: 2-8°C保存, 有效期一年。

产品内容:

名称	50T	100T	储存条件
组分 A: 跨膜蛋白提取液 A	10ml	20ml	2-8°C保存
组分 B: 跨膜蛋白提取液 B	20ml	40ml	2-8°C保存
组分 C: 膜蛋白溶解液 C	10ml	20ml	2-8°C保存
组分 D: 蛋白酶抑制剂混合物	250µl	500µl	-20°C保存
组分 E: 磷酸酶抑制剂混合物	250µl	500µl	2-8°C保存

注:

1. 蛋白酶抑制剂未开盖使用前也可以2-8°C储存。开盖使用后-20°C储存。
2. 蛋白酶抑制剂在2-8°C低温时是固体状态, 从冰箱取出后恢复至室温或37°C短时间水浴, 变成液体状态后离心至管底部再开盖。
3. 试剂拆封后请尽快使用完!

产品简介:

动物跨膜蛋白承担各种生物功能, 在疾病的发生、发展过程中扮演重要角色。跨膜蛋白样品的制备需要充分考虑到与下游的胶分析及质谱分析等应用配套, 因此跨膜蛋白样本制备成为一个难以逾越的挑战。

细胞跨膜蛋白提取试剂盒是一种高效的高产跨膜蛋白提取试剂盒。本试剂盒提供全套试剂, 适用于从动物细胞和组织温和、高效地抽提膜/跨膜蛋白和膜蛋白复合物。用本试剂盒抽提和富集到的蛋白包括从分子量很小到很大的蛋白, 单次跨膜至7次以上的蛋白, 甚至一些大的蛋白复合物。提取过程简单方便。提取的膜蛋白不仅纯度高, 保持天然活性, 而且绝少交叉污染。

本试剂盒提取的蛋白可用于Western Blotting、蛋白质电泳、免疫沉淀、ELISA、转录活性分析、Gel shift 凝胶阻滞实验、酶活性测定等下游蛋白研究实验。

自备试剂和仪器:

离心机、振荡器、匀浆机/匀浆器、涡旋混匀器、移液器、冰箱、冰盒, PBS缓冲液、蛋白定量试剂盒, 离心管、吸头、一次性手套

产品特点:

- 1、使用方便, 从细胞, 组织中提取蛋白不需经过研磨、反复冻融、超声破碎等前处理。
- 2、提取过程简单方便。
- 3、含蛋白稳定剂, 提取的蛋白稳定。
- 4、紫外检测蛋白浓度时, 背景干扰低。
- 5、蛋白酶抑制剂抑制了蛋白的降解, 蛋白酶抑制剂配方优化。蛋白酶抑制剂混合物包含 6 种独立的蛋白酶抑制剂, 每一种抑制剂可特异性抑制某一种或几种蛋白酶活性。该混合物优化的组成

使其可以抑制几乎所有重要的蛋白酶活性，包括丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、丙氨酰-氨基肽酶等。

使用方法：

一、使用注意事项：

1. 正式实验前请选取几个样本做预实验，以优化实验条件，取得最佳实验效果
2. 螺旋盖微量试剂管装的试剂在开盖前请短暂离心，将盖和管内壁上的液体离心至管底，避免开盖时试剂损失。
3. 实验过程中的所有试剂须预冷；所有器具须放-20℃冰箱预冷。整个过程须保持样品处于低温。
4. 蛋白酶抑制剂储存期间溶液如果出现沉淀，不影响使用，溶解后正常使用。
5. 如果试剂盒不能短时间内用完，蛋白酶抑制剂混合物不可以一次全部加入提取液。
6. 可以根据自己实验需要加入其它蛋白酶抑制剂单品。
7. 下游实验如果是进行特定蛋白酶或磷酸酶的酶活性检测，提取液可以不加蛋白酶抑制剂或磷酸酶抑制剂，注意提取过程保持低温操作，缩短离心时间。
8. 禁止与其他品牌的试剂混用，否则会影响使用效果。
9. 样品或试剂被细菌或真菌污染或试剂交叉污染可能会导致错误的结果。

二、细胞跨膜蛋白提取

1. 提取液制备：

每 500ul 冷的蛋白提取液 A 中加入 2ul 蛋白酶抑制剂混合物和 2ul 磷酸酶抑制剂，混匀后置冰上备用。

每 500ul 膜蛋白溶解液 C 中加入 2ul 蛋白酶抑制剂混合物和 2ul 磷酸酶抑制剂，混匀后置冰上备用。

2. 收集 $5-10 \times 10^6$ 个以上细胞，在 4℃，500×g 条件下离心 2-3 分钟，小心吸取培养基，尽可能吸干。
3. 用冷 PBS 洗涤细胞两次，每次洗涤后尽可能吸干上清。
4. 细胞样品中加入 200μl 冷的试剂 A，高速涡旋振荡 5 秒，置 2-8℃振荡 20 分钟-1 小时。
5. 再次高速涡旋振荡 5 秒，然后在 4℃，13000×g 条件下离心 5 分钟。
6. 将上清吸入另一预冷的干净离心管，37℃水浴 10 分钟。
7. 在 37℃条件 500-2000×g 离心 3 分钟，此时溶液分为两层，下层是跨膜蛋白约为 20-40μl。
8. 小心移除上层。下层粘稠状液体即为跨膜蛋白样品。
9. 用 150-200μl 冰冷的试剂 B 稀释下层跨膜蛋白，混匀后冰浴 2 分钟，37℃水浴 10 分钟，37℃条件下 2000×g 离心 3 分钟，此时溶液分为两层，下层是跨膜蛋白部分约为 20-40μl。
10. 按步骤 7 再次抽提下层(此步骤可以选做)。
11. 小心移除上层。用 50-200μl 冰冷的试剂 C 溶解下层，即得跨膜蛋白。
12. 将上述蛋白提取物定量后分装于-80℃冰箱保存备用或直接用于下游实验。

三、组织跨膜蛋白提取

1. 提取液制备：

每 500ul 冷的蛋白提取液 A 中加入 2ul 蛋白酶抑制剂混合物和 2ul 磷酸酶抑制剂，混匀后置冰上备

用。

每 500ul 膜蛋白溶解液 C 中加入 2ul 蛋白酶抑制剂混合物和 2ul 磷酸酶抑制剂，混匀后置冰上备用。

2. 取 50-100 mg 组织样本用手术剪刀尽可能剪碎，加入冷的蛋白提取液 A，用组织匀浆机/匀浆器匀浆至无明显肉眼可见固体，将匀浆吸入另一预冷的干净离心管。

3. 按照细胞蛋白的提取方法的第 3 步骤往下操作即可。

常见问题分析：

1.蛋白浓度低？

膜蛋白丰度比较低，在条件允许的情况下，需要尽可能加大细胞的上样量以提高膜蛋白浓度。

处理部分组织样本时可能没有裂解完全，导致蛋白浓度低。只要适当延长试剂A的处理时间即可。最好在持续振荡的条件下处理，没有振荡器也可间隔几分钟用吸头吹打混匀。

2.用什么方法定量蛋白？

建议用BCA法。不适合用Bradford 法，因为试剂A中含有干扰Bradford法的组份，导致定量不准。如果已经进行过透析处理或者用脱盐柱改换过缓冲体系，则可以用Bradford法定量。

3. 提取的蛋白具有活性吗？

本试剂盒不含有离子型去垢剂组份，不破坏蛋白的结构，没有对蛋白质之间原有的相互作用的破坏，蛋白均保持其天然构象和活性。

4.膜蛋白电泳没有条带？

膜蛋白样品通常浓度较低，电泳前一定要进行蛋白定量，以保证电泳是蛋白上样量足够。

膜蛋白提取好后，用溶解液充分溶解后，可以超声处理一下，再进行蛋白定量。

蛋白加Loading buffer后可以不用煮沸，采用50°C保温30分钟。

蛋白Loading buffer中SDS终浓度含量可以提高至3%-10%。

有些样品的膜蛋白含量太低，可以使用丙酮沉淀膜蛋白，再使膜蛋白溶解于上样缓冲液中，一般可以跑出清晰的蛋白条带。

电泳时最好采用低电压低电流电泳。

注意事项：

1. 本试剂盒仅供科学研究使用，不可用于诊断或治疗。

2. 最好使用一次性吸头、管、瓶或玻璃器皿，可重复使用的玻璃器皿必须在使用前清洗并彻底清除残留清洁剂。

3. 实验后完成后所有样品及接触过的器皿应按照规定程序处理。

4. 避免皮肤或粘膜与试剂接触。

5. 如果试剂不小心接触皮肤或眼睛，应立即用水冲洗。