

## 膜蛋白提取试剂盒

货号: EX1110

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
试剂 A: 蛋白提取液 A	20ml	40ml	2-8°C保存
试剂 B: 蛋白提取液 B	20ml	40ml	
试剂 C: 膜蛋白溶解液 C	10ml	20ml	
试剂 D: 蛋白酶抑制剂混合物	200ul	400ul	-20°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:

膜蛋白提取试剂盒是一种快速高效的高产膜蛋白提取试剂盒。本试剂盒提供全套试剂, 适用于从动物细胞和动物组织提取总膜蛋白。提取过程简单方便, 可在1小时内完成。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。

本试剂盒含有的独特配方能够有效溶解细胞膜组份, 包括细胞质膜、核膜和各种细胞器膜。本试剂盒含有的蛋白酶抑制剂混合物, 阻止了蛋白酶对蛋白的降解, 为提取高纯度的蛋白提供了保证。

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。

本试剂盒提取的蛋白为具有天然蛋白构象的活性蛋白。

本试剂盒中不含有EDTA, 与金属螯和层析等下游应用兼容。

### 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、将蛋白提取的时间缩短至1小时。
- 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. 禁止与其他品牌的试剂混用，否则会影响使用效果。
4. 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。
5. 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。
6. 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。
7. 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。
8. 可以根据自己实验需要加入其它蛋白酶抑制剂单品。
9. 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。

### 二、操作步骤

#### 细胞膜蛋白提取：

##### 1、提取液准备：

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

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

- 2、取5-10×10<sup>6</sup>个细胞，在4℃，500×g条件下离心5分钟，小心吸取培养基，尽可能吸干收集细胞。
- 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-400μl冷的试剂A，充分混匀。
- 5、在2-8℃条件下振荡20-30分钟，至细胞充分裂解，细胞沉淀明显减少。
- 6、在4℃，12000×g条件下离心5分钟。
- 7、将上清吸入另一干净离心管，在37℃水浴5-10分钟。
- 8、在37℃，1000×g离心5分钟，此时溶液分为两层，下层是膜蛋白约为30-50μl。
- 9、小心移除上层液体，收集上层部分留作备用分析。
- 10、用150-200μl冰冷的试剂B充分溶解下层膜蛋白部分，混匀后冰浴2分钟，37℃水浴5-10分钟，37℃，1000×g离心5分钟，此时溶液分为两层，下层是膜蛋白约为30-50μl。小心移除上层液体，保留下层。
- 11、按以上步骤再次抽提下层膜蛋白(此步骤可以选做，一般不需要做)。
- 12、用50-200μl冷的试剂C膜蛋白溶解液溶解下层膜蛋白部分，即得膜蛋白。
- 13、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。

#### 组织样本膜蛋白提取：

##### 1、提取液准备：

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

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

- 2、取50mg-100mg适量组织样本，用冷PBS洗干净，然后用手术剪刀尽可能剪碎，加400 $\mu$ l冷的试剂A，用组织匀浆机/器匀浆至无明显肉眼可见固体。
- 3、将组织匀浆吸入一预冷的干净离心管中，在4 $^{\circ}$ C条件下振荡20-30分钟。
- 4、按照细胞蛋白的提取方法的第（5）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. 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 $^{\circ}$ 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。

膜蛋白丰度通常较低，有条件可以尝试用银染染色。

##### **4. 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。

#### **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。