

细胞膜蛋白与细胞浆蛋白提取试剂盒

Cat.No:WB3102

Size: 50T

产品介绍

本蛋白提取试剂盒可简单高效地从细胞中提取膜蛋白和核蛋白，得到的膜蛋白不仅包含细胞膜蛋白，还包含部分亚细胞器的膜蛋白(如：线粒体膜、内质网膜、高尔基体膜等)。原理是通过匀浆破碎细胞，低速离心去除细胞核和少数未破开的细胞沉淀，随后取上清高速离心获得胞浆蛋白上清和细胞膜碎片的沉淀，最后再加裂解液以获取沉淀中的膜蛋白。本产品提取得到的核蛋白和膜蛋白均可用于蛋白免疫印迹，免疫沉淀等后续实验。

组分	规格
蛋白提取试剂 A	55ml
蛋白提取试剂 B	12ml

操作步骤

- 1、将融化后的蛋白提取试剂 A 和蛋白提取试剂 B 放置于冰上，按样本量分别取出蛋白提取试剂 A 和蛋白提取试剂 B，按体积比添加至 1X 蛋白酶抑制剂（货号：P001）。
- 2、A. 收集细胞（2000 万-4000 万），4℃，500g 离心 5min 以沉淀细胞。用预冷的 PBS 洗涤并弃干净上清，然后在冰上加入 1 ml 预冷的蛋白提取试剂 A（已添加蛋白酶抑制剂）。
B. 取不超过 50mg 已清洗好的新鲜组织，剪切成细碎，加入 1 ml 预冷的蛋白提取试剂 A（已添加蛋白酶抑制剂），悬浮组织碎片冰浴放置 10min。组织重量不足 25mg 的，裂解液用量始终不少于 0.5ml，以下步骤也无需调整。
- 3、样品悬液转移到合适大小的预冷玻璃匀浆器中，冰浴条件下对样品匀浆 30-50 次。不同细胞或组织所需的匀浆次数不同，需自行优化。通常可以在匀浆 30 次后取约 2-3ul 细胞或组织匀浆液滴在盖玻片上并在显微镜下观察，如见细胞核周晕环或完整的细胞形态，说明细胞仍完整。如果有 70-80% 的细胞均无核周晕环和完整细胞形态，说明细胞已经充分破碎，可行下一步实验。否则，重新匀浆 10-30 次直到细胞至少 70% 已经破碎。

注意：如果没有适当的玻璃匀浆器可反复冻融法来破碎细胞。将步骤 2 中的样品在液氮/-80 度和室温依次反复冻融几次，然后取少量样品在显微镜下检测细胞破碎的程度直到破碎的程度大于 70%。

- 4、将匀浆好的样品于 4℃，700g 离心 10min，收集较纯的上清（宁可少吸也不要接触沉淀）。
- 5、将收集的上清于 4℃，14000g 离心 30 min，沉淀为细胞膜碎片，上清主要为胞浆蛋白。

注意：吸取上清时要尽量吸尽上清，可以大小相接的枪尖轻轻触碰到细胞膜沉淀。

- 6、向收集到的沉淀中加入 200 微升蛋白抽提试剂 B（已添加蛋白酶抑制剂）。在涡旋仪上高速剧烈涡旋，涡旋 10s 停 10s 总计共 2min，

冰浴 10min，重复涡旋及冰浴步骤 2 次，以充分裂解膜蛋白。

7、最后 4℃，14000 g 离心 10 min，收集上清即为细胞膜蛋白，可-70℃保存备用。

注意：注意所用的一抗适用条件是否支持蛋白煮沸再进行后续步骤。用于跨膜蛋白检测的膜蛋白样品可以 37℃水浴 45min 代

替 100℃沸水浴 5min，此时蛋白不易沉淀，可以有效保留蛋白的三级结构，例如一些 ATPase、ABC、SLC、GLUT 家族蛋白等。

运输和保存方式

-20℃保存，冰袋运输，至少 1 年有效；

注意事项

1. 需取新鲜样本制备以及建议低温下实验操作。
2. 蛋白抽提试剂 A 和 B 的用量可根据细胞量等比例扩大。
3. 制备膜蛋白样品前蛋白提取试剂 A 和试剂 B 都需加入蛋白酶抑制剂（推荐货号：P001）。用于磷酸化抗体的可选择蛋白酶加磷酸酶抑

制剂混合物（推荐货号：P002）。

4. 本试剂盒为低温运输，使用前需室温或水浴（低于 37℃）融化。
5. 本产品仅限科研使用。

