



# 膜蛋白提取试剂盒说明书（简化版）

（W035-1-1）

## 【产品简介】

本试剂盒提供独特的组份提取细胞及组织中的膜蛋白。特殊的提取Buffer在裂解细胞的同时，经过特殊处理，还可以选择性地分离提取细胞膜蛋白和胞器质膜蛋白。提取方法简单，可靠，快速。获得的膜蛋白纯度高，可用于SDS-PAGE电泳、Western Blot、免疫共沉淀，细胞信号传导等后续研究，每次可以提取 $10^7$ 个培养细胞或200mg动物组织，本试剂盒可以使用50次。

## 【试剂盒组成】

- 1、洗涤液 10×50ml
- 2、提取Buffer 50ml
- 3、蛋白酶抑制剂 50 $\mu$ l
- 4、Loading Buffer 1ml
- 5、DTT 50 $\mu$ l

## 【产品特点】

- 1、整个操作过程只需要60分钟左右。
- 2、即可以用于培养细胞（ $50 \times 10^7$ 个），有可以用于动物组织（ $50 \times 200$ mg）蛋白质的提取。
- 3、避免蛋白酶对蛋白质的降解，保持膜蛋白质的完整性和天然活性。
- 4、提取的膜蛋白纯度高，不需要超速度离心，可以同时处理多个样品。

## 【运输和保存条件】

在常温下运输，收到后，将蛋白酶抑制剂，Loading Buffer，DTT 在-20度的环境中保存，其余4℃保存，保质期一年。

## 【操作步骤】

- 1、对于悬浮培养或用细胞刮子刮下的贴壁培养的细胞，离心收集不少于 $1 \times 10^7$ 细胞，再用预冷的双蒸水稀释的一倍浓度的洗涤液洗涤细胞三次（每次3000 rpm离心5 min）。
- 2、组织样本（200mg）尽量去除脂肪组织和结缔组织等非目的组织，于冰上剪碎后，再用预



冷的一倍浓度的洗涤液洗涤细胞三次。

- 3、在上述细胞或组织样本中加入1ml提取Buffer（使用前，每ml提取Buffer加入1 $\mu$ l蛋白酶抑制剂和1 $\mu$ l DTT），4 $^{\circ}$ C下玻璃匀浆器上下手动匀浆30-50次。或超声破碎细胞，每次30S，3~4次，每次间隔1min，置于冰上冷却。均质匀浆或超声破碎细胞后应镜检，细胞破碎率不小于90%，同时没有明显的组织小块。
- 4、装入1.5毫升的预冷的离心管中，冰上放置10分钟左右,期间取出剧烈震荡2-3次，于4 $^{\circ}$ C，14000 rpm离心10 min，弃沉淀，上清转至新管中。
- 5、上清置于37 $^{\circ}$ C水浴10min。再室温，13 000rpm离心5min，样品分成上层和下层（含膜蛋白）。
- 6、取下层，加入500 $\mu$ l冰冷灭菌水，4 $^{\circ}$ C放置5min，再置于37 $^{\circ}$ C水浴10min。
- 7、室温，13000rpm离心5min，样品分成上层和下层（含膜蛋白）。
- 8、取下层，加入500 $\mu$ l冰冷灭菌水，4 $^{\circ}$ C放置5min，再置于37 $^{\circ}$ C水浴10min。
- 9、室温,13 000rpm离心5min，样品分成上层和下层（含膜蛋白）。
- 10、最终得到的下层即为膜蛋白提取物，BCA法测定蛋白含量，分装冷冻保存。

#### 【SDS-PAGE电泳操作步骤】

- 1、每100 $\mu$ l膜蛋白提取混合物加入0.9ml丙酮，冰浴20分钟，10000rpm离心20分钟。
- 2、弃上清，沉淀真空旋干或置冰上干燥约10 min（敞开离心管盖），加入适当体积的Loading Buffer（使用前每100 $\mu$ l Loading Buffer加入2~5 $\mu$ l巯基乙醇）溶解，彻底分散（枪头反复吹吸或剧烈涡旋）。