



细胞膜和胞质蛋白试剂盒说明书（简化版）

（W036-1-1 Membrane and cytoplasmic protein extraction kit）

一、产品简介

本试剂盒用于从哺乳动物组织和培养细胞中提取膜蛋白和胞质蛋白，提取制备过程简便。匀浆后的匀浆液经过低速离心去除未破碎细胞和细胞核后的上清，再高速离心得到上清中含有胞质蛋白，沉淀经过溶解后，得到膜蛋白。制备的膜蛋白和胞浆蛋白能保持天然活性，并且纯度较高。提取的蛋白可用于进一步的转录因子活性分析、凝胶阻滞实验(Gel Shift Assay)、免疫共沉淀、Western Blotting和酶活性测定等后续蛋白质研究，可以用于培养细胞或动物组织中蛋白质的提取。每次可以处理 10^7 个细胞或100mg动物组织，可以使用50次。

二、产品特点

- 1、提取的蛋白最大限度的保持活性，可以用于Pull Down，EMSA，IP，酶活性检测等试验；
- 2、内含有蛋白酶和磷酸酶抑制试剂可以避免蛋白质的酶解和蛋白质磷酸化破坏；
- 3、整个试验过程只需要2个小时左右。无需超速离心，并可以同时处理多个样本；
- 4、既可以直接用于培养细胞（ 50×10^7 ），也可以用于动物组织（ $50 \times 100\text{mg}$ ）蛋白质提取。

三、试剂组成和配制：50T

试剂编号	试剂名称	试剂装量	保存条件
R1	缓冲液A	50ml	-20℃保存
R2	缓冲液B	30ml	2-8℃保存
R3	DTT	80μl	-20℃保存
R4	蛋白酶抑制剂	80μl	-20℃保存
R5	磷酸酶抑制剂	400μl	-20℃保存
R6	PMSF	800μl	-20℃保存

注：此试剂可以在常温下运输，在上述环境下可以保存一年。



四、操作步骤

- 1、对于悬浮培养的细胞，取培养细胞 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个，弃去培养液，细胞用预冷的一倍PBS洗涤两遍；
- 2、如果是组织样本，将100mg组织剪切成小块，尽量去除脂肪组织和结缔组织等非目的组织，加入适量的冰冷PBS洗涤两次后，4°C，3000 rpm离心3min，弃上清；
- 3、将以上收集的细胞或组织中加入1000 μ l预冷的溶液A（使用前每1ml溶液A 加入1 μ l DTT，10 μ l PMSF，1 μ l蛋白酶抑制剂和5 μ l磷酸酶抑制剂），置玻璃匀浆器冰上均质30~50次，或超声破碎细胞，每次30 sec，3~4次，每次间隔1 min，置于冰上冷却。均质或超声破碎细胞后应镜检，细胞破碎率不小于90%；
- 4、将匀浆液转移至冷的离心管中，于4°C，4100rpm离心10min，去除沉淀。
- 5、将上清转移至新冷离心管中，于4°C，18000rpm离心60min，上清转至新管中，为胞质蛋白，冷冻保存。
- 6、在离心沉淀物中加入500 μ l预冷的溶液B（使用前每1 ml溶液B 加入1 μ l DTT，10 μ l PMSF，1 μ l蛋白酶抑制剂和5 μ l磷酸酶抑制剂），涡旋震荡10s，在冰上放置30min，期间取出震荡5-6次；
- 7、4°C，16000rpm，离心10min，尽快将上清转入一遇冷的洁净微量离心管，得到膜蛋白，分装并保存于-80°C，避免反复冻融。