For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures

USER GUIDE **MesGen Biotechnology**

**Version 2.0**

|  |
| --- |
| **细胞膜和胞质蛋白提取试剂盒** |

Membrane and Cytoplasmic Protein Extraction kit

**Cat.No. PM2815**

**Size : 50 tests □ 100 tests □ 300 tests □**

Technical literature is available at: [www.mesgenbio.com](http://www.mesgenbio.com). E-mail MesGen Technical Services if you have questions on use of this system: [tech@mesgenbio.com](mailto:tech@mesgenbio.com)

**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。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107个细胞或100~300 mg动物组织。**试剂盒组成**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 产品组成 | 50T | 100T | 300T |
| Solution A | 50ml | 100ml | 300ml |
| Solution B | 50ml | 100ml | 300ml |
| Protease inhibitor C | 100ul | 200ul | 600ul |
| Protease inhibitor P | 1000ul | 2000ul | 6000ul |
| Phosphatase Inhibitor | 500ul | 1000ul | 3000ul |
| DTT Solution | 100ul | 200ul | 600ul |

**产品特点**

1. 提取所得蛋白保持较完整的活性，可应用于后续的Pull Down, EMSA, IP, Enzyme Activity Assay 等；
2. 尽可能避免蛋白质酶解和蛋白质磷酸化状况的破坏；
3. 实验方便、快捷；
4. 提取的膜蛋白纯度高，不需要超速离心，可同时处理多个样品。

****

**Do not eat**

**注意事项**

1. 提取后的膜蛋白质部分含有较高的表面活性剂；
2. 试剂及实验器具均需预冷后使用；
3. 如果蛋白提取量不足，可适当增加细胞或组织的样本量；

**操作方法**

1．准备细胞或组织样品：

A．细胞样品

**贴壁细胞：**取5×106-1×107培养细胞，用PBS（推荐使用Cat # MG3150 ）洗一遍，刮下细胞或用含有EDTA（不含胰酶，以免其降解需抽提的目的膜蛋白）的细胞消化液处理细胞使之不再紧密贴壁，用移液器吹打下细胞。离心收集细胞，吸除上清，留下细胞沉淀备用。

**悬浮细胞：**取5×106-1×107培养细胞，直接离心收集细胞，吸除上清，留下细胞沉淀备用。

B．组织样品

取约100-300mg组织，尽量去除脂肪组织和结缔组织等非目的组织，用剪刀于冰上小心剪切成细小组织碎片。

2．样品洗涤：

用500uL预冷PBS（推荐使用Cat#MG3150 ）漂洗样品三次，每次600g离心5min。

3． 将以上收集的细胞或组织中加入1mL预冷的**Solution A**（使用前每1mL **Solution A**加入1uL **DTT Solution**、5uL **Phosphatase Inhibitor**、1uL **Protease inhibitor C**、10uL **Protease inhibitor P**），置玻璃匀浆器冰上均质30~50次，或超声破碎细胞，每次30sec，3~4次，每次间隔1min，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％。备注：通常可以在匀浆30次后取约2-3 uL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(Ashinyringaroundthenuclei)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，则进行下一步实验。否则，重新匀浆10~30次直到细胞至少70%已经破碎。

4. 将匀浆液转移至冷的离心管中，于4°C, 4100rpm（1000g）离心10 min，去除沉淀。沉淀中为未破碎的细胞、细胞核和一些细胞碎片。

5. 将上清转移至新冷离心管中，于4°C, 18000rpm 离心60min，上清转至新离心管中，为胞质蛋白，冷冻保存。

备注：本步骤的离心时间可以根据蛋白样品的分离效果进行缩短或延长，离心时间越长分离效果越显著。

6. 在沉淀中加入1mL预冷的**Solution B**（使用前每1mL **Solution A**加入1uL **DTT Solution**、5uL **Phosphatase Inhibitor**、1uL **Protease inhibitor C**、10uL **Protease inhibitor P**），涡旋震荡10s，在冰上放置30 min，期间取出震荡5~6 次。

注意：因**Solution B**在室温时会分层，请务必于4°C混匀后加入。

7. 4°C, 16000rpm离心10 min，取上清转移至新离心管（注意勿将沉淀带入上清）。

8. 置于水浴37°C 10min。

9. 室温，16000rpm离心5min，样品分成上层和下层（含膜蛋白）。

10. 取下层，加入500ul冰冷灭菌水，4°C放置5min。

11. 置于水浴37°C 10min。

12. 室温，16000rpm离心5min，样品分成上层和下层（含膜蛋白）。

13. 取下层，加入500ul冰冷灭菌水，4°C放置5min。

14. 置于水浴37°C 10min。

15. 室温，16000rpm离心5min，样品分成上层和下层（含膜蛋白）。

16. 最终得到的下层为膜蛋白提取物，分装并保存于-80°C，避免反复冻融。

**附录资料（针对膜蛋白）**

**SDS-PAGE电泳前样品准备**

1. 每100 μl膜蛋白提取混合物加入0.9 mL丙酮，冰浴20 min，13000 rpm离心20 min。

2. 弃上清，沉淀真空旋干或置冰上约10-30 min（敞开离心管盖）。

3. 该步可选：可以加入Urea、Thiourea、NDSB-201等强溶解能力试剂溶解膜蛋白，分装，冷冻保存。

4. 加入适当体积的Loading Buffer（使用前每100 μl Loading Buffer 加入2~5 μl巯基乙醇）溶解，彻底分散（枪头反复吹吸或剧烈涡旋），煮沸5 min，离心取上清。

**储存条件**

**Solution A**和**Solution B** 置于2-8°C保存；

**DTT Solution、Phosphatase Inhibitor、Protease inhibitor C和Protease inhibitor P**置于-20°C保存；

**备注：Solution B**在室温时会分层，因此在使用前，务必保存于2-8°C遇冷以保持清亮状态至关重要。

**仅供科学研究，不得用于临床治疗**

**For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures.**