For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures

Version 2.0

细胞膜和胞质蛋白提取试剂盒

Membrane and Cytoplasmic Protein Extraction kit

Do not eat

Cat.No. PM2815

Size : 50 tests ☐ 100 tests ☐ 300 tests ☐

Technical literature is available at: www.mesgenbio.com. E-mail MesGen Technical Services if you have questions on use of this system: 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10^7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。

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 5×10^6-1×10^7 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 5×10^6-1×10^7 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.