

## Membrane and Cytosol Protein Extraction Kit

### 细胞膜/细胞浆蛋白抽提试剂盒

#### 产品信息

产品名称	产品编号	规格	储存
Membrane and Cytosol Protein Extraction Kit 细胞膜/细胞浆蛋白抽提试剂盒	20127ES50	50T	-20°C
Membrane and Cytosol Protein Extraction Kit 细胞膜/细胞浆蛋白抽提试剂盒	20127ES60	100T	-20°C

#### 产品描述

细胞膜/细胞浆蛋白抽提试剂盒用于快速便捷分离细胞/组织细胞膜和细胞浆蛋白, 抽提的膜蛋白不仅包括质膜上的蛋白, 也包括线粒体膜、内质网膜以及高尔基体膜等上的膜蛋白。主要工作原理: 通过匀浆适度破碎细胞, 经低速离心去除细胞核和少数未破碎的细胞产生的沉淀, 随后取上清高速离心获得细胞膜沉淀和含有细胞浆蛋白的上清, 然后通过优化的膜蛋白抽提试剂从沉淀中抽提获取膜蛋白。整个过程仅需约 90 min 即可完成, 抽提得到的蛋白可以用于 SDS-PAGE, Western、酶活性测定等后续实验。

膜蛋白抽提试剂中含有蛋白酶抑制剂、磷酸酯酶抑制剂和 EDTA 等, 后续不适合用于蛋白酶、磷酸酯酶等受这些抑制剂影响的酶的活性测定, 但抽提获得的膜蛋白或细胞浆蛋白适合用于检测蛋白的磷酸化水平。

按照说明书步骤的用量 (细胞  $2-5 \times 10^7$  个; 组织约 100 mg), 20127ES50/20127ES60 可分别进行 50 个和 100 个样品的抽提, 具体用量可根据不同的样品体积进行调整。

#### 产品组分

组分编号	组分名称	产品编号/规格	
		20127ES50(50T)	20127ES60(100T)
20127-A	Reagent A 试剂 A	50 mL	100 mL
20127-B	Reagent B 试剂 B	15 mL	30 mL

#### 运输和保存方法

冰袋运输。-20°C 保存, 有效期 1 年。

#### 注意事项

- 1) 客户需自备 PMSF, PMSF 需现配现用, 建议在抽提试剂加入到样品前 2-3 min 加入, 以防失效。
- 2) 利用本试剂盒抽提到的细胞膜/细胞浆蛋白可直接用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型) (Yeasten Cat#20201) 测定其浓度, 但不适合用 Bradford 法测定。
- 3) 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

#### 使用方法

室温融解并混匀试剂 A 和 B, 融解后立即置于冰上。取适量的试剂 A 和 B 备用, 在使用前数分钟内加入 PMSF, 使其最终浓度为 1 mM。

##### 1 样品准备

##### 1) 细胞样品

##### ① 细胞收集

贴壁细胞: 培养细胞约  $2-5 \times 10^7$  个, PBS 清洗一遍, 用细胞刮子刮下细胞或用含有 EDTA 但不含胰酶的细胞消化液处理细胞,

并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。

**【注】:** 尽量避免用胰酶消化细胞, 以免胰酶降解需抽提的目的膜蛋白。

悬浮细胞: 培养细胞约  $2-5 \times 10^7$  个, 离心收集细胞, 吸除上清, 留下细胞沉淀备用。

## ② 细胞清洗

用适量冰浴预冷的 PBS 轻轻重悬细胞沉淀, 取少量细胞用于计数, 剩余细胞  $4^{\circ}\text{C}$ , 600 g 离心 5 min 沉淀细胞。弃上清, 随后  $4^{\circ}\text{C}$ , 600 g 离心 1 min, 以沉淀离心管管壁上的残留液体并进一步沉淀细胞, 尽最大努力吸尽残留液体。

③ 细胞预处理: 把 1 mL 试剂 A (含 PMSF) 加入至上述细胞中, 轻轻并充分悬浮细胞, 冰浴放置 10-15 min。

## 2) 组织样品

取约 100 mg 组织, 用剪刀尽量小心剪切成细小的组织碎片。加入 1 mL 试剂 A (含 PMSF), 轻轻悬浮组织碎片, 冰浴放置 10-15 min。

**【注】:** 如果组织样品比较少, 也可以使用更少的组织量, 例如 30-50 mg, 后续试剂的用量及操作步骤不变; 组织用量较少时, 最后获得的膜蛋白也较少。

## 2 样品的破碎及破碎效果的鉴定

① 样品匀浆: 把细胞悬液或组织样品转移到一适当大小的冰浴预冷玻璃匀浆器中, 匀浆约 30-50 下。**【匀浆效果与细胞类型和组织类型相关, 不同细胞或组织所需的匀浆次数有所不同, 需自行优化。】**

② 通常在匀浆 30 次后取约 2-3  $\mu\text{L}$  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(A shiny ring around the nuclei)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。同时记录对于该细胞的匀浆次数, 通常在后续实验时不必再摸索匀浆次数。另外需注意特定的匀浆次数和匀浆器也有关, 需同时注意记录使用的是哪一个匀浆器。

**【注】:** 如果没有适当的玻璃匀浆器, 对于培养的细胞也可以采用反复冻融法来破碎细胞。把样品在液氮和室温依次反复冻融两次, 然后取少量样品在显微镜下检测细胞破碎的程度。如果细胞破碎的程度不足 70%, 可增加冻融次数, 直到细胞破碎的程度大于 70%。

## 3 去除细胞核和未破碎的细胞

$4^{\circ}\text{C}$ , 700 g 离心 10 min, 小心收集上清液至一新的离心管中。

**【注】:** 吸取上清时切勿接触沉淀! 可以有约 30-50  $\mu\text{L}$  上清液残留不予吸取, 以保证吸取的上清液有较高的纯度。

## 4 沉淀细胞膜碎片

$4^{\circ}\text{C}$ , 14,000 g 离心 30 min, 以沉淀细胞膜碎片。

## 5 收集细胞浆蛋白

吸取上清至 1 新的离心管中, 即为细胞浆蛋白, 可  $-70^{\circ}\text{C}$  保存备用。吸取上清时可以有 30-50  $\mu\text{L}$  上清残留, 以避免接触沉淀导致上清样品被污染。

## 6 抽提膜蛋白

$4^{\circ}\text{C}$ , 14,000 g 离心 10 s, 尽最大努力吸尽上清。可以轻轻触碰到沉淀, 甚至吸走很少量的沉淀。加入试剂 B 200  $\mu\text{L}$  (如有必要, 也可加大到 300  $\mu\text{L}$ ), 最高速剧烈 Vortex 5 s 重悬沉淀, 冰浴 5-10 min。重复前述步骤的 vortex 和冰浴孵育 1-2 次, 以充分抽提膜蛋白。随后,  $4^{\circ}\text{C}$ , 14,000 g 离心 5 min, 收集上清即为细胞膜蛋白溶液。可  $-70^{\circ}\text{C}$  保存备用。对于一些有特殊用途的膜蛋白, 可自行配制适当的膜蛋白抽提试剂进行膜蛋白抽提。