

# 膜蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒（次序去污剂法）

说明书修订日期：2021.06.25

Cat Number: KGP350/KGP3100

Store at -20°C for 12 months

For Research Use Only（科研专用）

## 一、试剂盒说明

本试剂盒提供独特的组份提取细胞及组织中的膜蛋白。其原理是裂解细胞后，先离心分离出质膜粗提物，再利用多种不同的去污剂，综合分离出膜蛋白。产物不仅含细胞膜蛋白，也含胞器质膜蛋白。提取方法简单，可靠，快速。

凯基次序去污剂法膜蛋白获得的膜蛋白得率高，可用于PAGE电泳、Western Blot、免疫共沉淀等后续研究。

## 二、试剂盒组份

组份	KGP350 50 tests	KGP3100 100 tests	储存温度
Lysis Buffer	50mL	50mL× 2	2-8°C
抽提 Buffer	50mL	50mL× 2	
TCA 试剂	5mL	10mL	
溶解 Buffer	15mL	30mL	
蛋白酶抑制剂	50μL	100μL	-20°C
Loading Buffer	1mL	2mL	
DTT(1M)	50μL	100μL	-20°C, 避光

**注意：Lysis Buffer与抽提Buffer短期（1-2周）内使用可4 保存，如长期不使用需-20 保存。**

## 三、操作步骤

### I 实体组织蛋白的提取

1. 组织样本（200~300mg）尽量去除脂肪组织和结缔组织等非目的组织，于冰上剪碎；
2. 组织样本中加入1mL Lysis Buffer（注：使用前，每毫升Lysis Buffer加入1μL蛋白酶抑制剂和1μL 1M DTT），置玻璃均浆器冰上匀浆30~50次，置于冰上放置5分钟。均质或超声破碎细胞后应镜检，细胞破碎率不小于90%；
3. 将均浆液转移至冷的离心管中，于4°C，12000 rpm 离心5 min，取上清转移至新的离心管中，即为胞浆蛋白，分装冷冻保存。
4. 取离心所得沉淀，加入200uL冷的抽提Buffer，涡旋振荡混匀30s后，冰上放置5min，反复5次；
5. 4°C,12000rpm 离心10min，取上清转移至新管，即为胞膜蛋白。Bradford法测定蛋白含量，分装冷冻保存。

### II 培养细胞蛋白提取

1. 收集不少于 $1 \times 10^7$ 细胞，用冷PBS（pH7.4）洗涤细胞两次（每次3000 rpm离心5 min）；
2. 在细胞样本中加入1mL Lysis Buffer（注：使用前，每mL Lysis Buffer加入1μL蛋白酶抑制剂和1μL 1M DTT），涡旋震荡30s，置于冰上1min，反复5次。破碎细胞后应镜检，细胞破碎率不小于90%；
3. 4°C，12000 rpm 离心10 min，转移上清至新的离心管中，即为胞浆蛋白，分装冷冻保存。
4. 取沉淀，加入200uL冷的抽提Buffer，涡旋振荡混匀30s后，冰上放置5min，反复5次；
5. 4°C,12000rpm 离心10min，取上清转移至新管，即为胞膜蛋白。Bradford法测定蛋白含量，分装冷冻保存。

蛋白浓缩步骤——SDS PAGE 电泳前操作步骤（选做）

- 1、进行 PAGE 电泳前，取该提取物，每 100 $\mu$ L 膜蛋白提取物，加入约 300 $\mu$ L 的溶解 Buffer 和约 100 $\mu$ L 三氯乙酸 (TCA) 试剂，混匀后置冰上 20~30 min 后，13 000rpm，离心 15 min，尽可能除去上清；(注)
- 2、沉淀加入 1mL 丙酮，室温静置 10min 后，13 000rpm 离心 15 min；(注)
- 3、弃上清，沉淀真空旋干或置冰上干燥约 10 min (敞开离心管盖)，以适当的溶解液溶解后，按体积比 loading buffer: 总体积=1: 5 的比例，加入 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)，煮沸 5min；【注：加入 Loading Buffer 后如有部分难溶物，可取上清继续上样；如加入 Loading Buffer 后溴酚蓝转呈黄色，此为少量 TCA 残留所致，不影响电泳结果。请参照 Marker 标准。】
- 4、上样进行 SDS PAGE 电泳。

**注意：本步骤为选做步骤，主要应用于得到的膜蛋白浓度小于 0.5ug/ul 的情况。蛋白经 TCA 和丙酮沉淀浓缩之后，再以相应的溶解液溶解。**

#### 四、注意事项：

- 1、所有的试剂及器具均需预冷后使用。细胞或组织量需达到要求。
- 2、SDS-PAGE 电泳前注意事项：如蛋白定量结果大于 1.0ug/ul，则电泳前步骤 1-2 的蛋白浓缩可以不做，直接加入 loading buffer，煮沸变性。