

凯基膜蛋白胞浆蛋白提取试剂盒（超速离心法）

说明书修订日期：2021.06.25

Cat Number: KGP350-1/KGP3100-1

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，再利用特殊的蔗糖密度离心溶液，选择性地分离提取膜蛋白，溶解Buffer含一种特殊的去污剂，在4°C时所有的蛋白质均可溶于抽提Buffer，提取方法简单，可靠，快速。

本试剂盒获得的膜蛋白纯度高，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	KGP350-1 50 tests	KGP3100-1 100 tests	储存温度
Lysis Buffer	25 mL	50 mL	2-8°C
蔗糖密度离心溶液 40%	20 ml	40 ml	
蔗糖密度离心溶液 30%	20 ml	40 ml	
蔗糖密度离心溶液 20%	20 ml	40 mL	
2x 溶解 Buffer	10 ml	20 mL	-20°C
1000×蛋白酶抑制剂	50μL	100μL	

注意：三个蔗糖密度离心溶液及溶解Buffer，因为含有蔗糖，时间久了可能会滋生霉菌，因此，如长期不使用时需-20 保存，如短期（1-2周）内使用，可4 保存。

三、操作步骤

注1：蔗糖密度离心溶液现用现配，在 1.5ml 离心管中以 1:1:1 的比例依次加入 20%，30%，40%的蔗糖，配制总体积为 900 微升的蔗糖密度离心溶液，备用；

注2：lysis buffer 临用前加入 1000×蛋白酶抑制剂（比例 v/v 为 1：1000）

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500微升 Lysis Buffer,置玻璃均浆器冰上均质30~50次（或超声破碎细胞，每次30 S, 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%；
- 3、将均浆液转移至冷的离心管中，于4°C, 3000 rpm 离心10 min，弃沉淀；
- 4、取上清转移至新冷离心管中，于4°C, 20000G离心15 min；
- 5、将所得上清小心转至配好的蔗糖密度离心溶液离心管中上层，100000G离心15min，所得上清即为胞浆蛋白；
- 6、取步骤5离心所得沉淀，加入 200 微升 2x 溶解 Buffer，涡旋振荡混匀后，4°C放置 10~15min，待全部溶解后，分装保存。

II 培养细胞蛋白提取

- 1、收集不少于 1×10^7 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500微升Lysis Buffer，置玻璃均浆器冰中均质30~50次（或超声破碎细胞，每次30 S, 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%；
- 3、将均浆液转移至冷的离心管中，于4°C, 3000 rpm 离心10 min，弃沉淀；
- 4、取上清转移至新冷离心管中，于4°C, 20000G 离心15 min；

- 5、将所得上清小心转至配好的蔗糖密度离心溶液离心管中上层，再100000G离心15分钟，所得上清即为胞浆蛋白；
- 6、取沉淀，加入200微升2x溶解Buffer，涡旋振荡混匀后，4℃放置10~15min，待全部溶解后，分装保存；

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。

凯基相关产品（详见凯基网站 <http://www.keygentec.com.cn>）

1、 蛋白提取

核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒
全蛋白提取试剂盒
膜蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒
线粒体蛋白提取试剂盒
磷酸化蛋白提取试剂盒（简易型）
活性蛋白提取试剂盒
红细胞裂解液

2、 蛋白定量

BCA 法蛋白定量检测试剂盒
Bradford 法蛋白定量检测试剂盒
Lowry 法蛋白定量检测试剂盒

3、 蛋白染色

蛋白质银染检测试剂盒
蛋白质考马斯亮蓝染色检测试剂盒
考马斯亮蓝蛋白快速染液

4、 蛋白分子量 Marker

5、 Western blotting 组装试剂盒

6、 Western blotting 化学发光试剂盒