

膜蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒（Triton X-114 法）

说明书修订日期：2015.07.13

Cat Number: KGP350-2/KGP3100-2

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，再利用特殊的抽提Buffer，选择性地分离提取膜蛋白，抽提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，但在37°C时，抽提Buffer分为水相和去污相；此时亲水性蛋白溶于水相，疏水的膜蛋白溶于去污剂相中，根据该性质分离出膜蛋白。

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

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，1000 rpm 离心5min，弃沉淀；
4. 取上清转移至新冷离心管中，于4°C，14 000 rpm 离心30 min，所得上清转移至新管中，即胞浆蛋白，分装冷冻保存；
5. 取步骤4离心所得沉淀，加入1mL预冷的抽提Buffer，涡旋振荡混匀后，4°C放置10~15min；【注：因抽提Buffer在室温时会分层，请务必于4°C混匀后加入】
6. 4°C，3000rpm 离心5min，取上清转移至新管（注意勿将沉淀带入上清），进行下步提取；
7. 置于37°C水浴10min；
8. 室温，13 000rpm离心5min，样品分成上层和下层（含膜蛋白）；【注：建议使用进口透明性较好的微量离心管，可见下层为含膜蛋白的有机相。上下两层因均为透明，只在交界处有一折光线，需仔细观察才可见到。或室温（或37°C）静置30分钟~1小时亦可见分层。以下亦同。】

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 1mL Lysis Buffer (注: 使用前, 每毫升 Lysis Buffer 加入 1 μ l 蛋白酶抑制剂和 1 μ l 1M DTT), 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. 取匀浆液转移至新冷离心管中, 于 4 $^{\circ}$ C, 14 000 rpm 离心 30 min, 所得上清转至新管, 即胞浆蛋白, 分装冷冻保存;
4. 取沉淀, 加入 1mL 冷的抽提 Buffer, 涡旋振荡混匀后, 4 $^{\circ}$ C 放置 10~15min; 【注: 因抽提 Buffer 在室温时会分层, 请务必于 4 $^{\circ}$ C 混匀后加入】
5. 4 $^{\circ}$ C, 3000rpm 离心 5min, 取上清转移至新管 (注意勿将沉淀带入上清), 进行下步提取;
6. 置于 37 $^{\circ}$ C 水浴 10min;
7. 室温, 13 000rpm 离心 5min, 样品分成上层和下层 (含膜蛋白); 【注: 建议使用进口透明性较好的微量离心管, 可见下层为含膜蛋白的有机相。上下两层因均为透明, 只在交界处有一折光线, 需仔细观察才可见到。或室温 (或 37 $^{\circ}$ C) 静置 30 分钟~1 小时亦可见分层。以下亦同。】

III 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 μ l 膜蛋白提取物, 加入约 300 μ l 的溶解 Buffer 和约 100 μ l 三氯乙酸 (TCA) 试剂, 混匀后置冰上 20~30 min 后, 13000rpm, 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, 13000rpm 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 μ l Loading Buffer 加入 2~5 μ 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 0.5 μ g/ μ l 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 1.0 μ g/ μ l, 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。

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

四、 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

五、 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

六、 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

七、 蛋白分子量 Marker

八、 Western blotting 组装试剂盒

九、 Western blotting 化学发光试剂盒