

膜蛋白提取试剂盒（蛋白组实验、质谱适用）

货号：EX2560

规格：50T/100T

有效期：2-8℃保存，有效期一年。

产品内容：

名称	50T	100T	储存条件
组分 A：膜蛋白提取液 A	20ml	40ml	2-8℃保存
组分 B：膜蛋白提取液 B	20ml	40ml	2-8℃保存
组分 C：膜蛋白溶解液 C	50ml	100ml	2-8℃保存
组分 D：蛋白酶抑制剂混合物	200ul	400ul	-20℃保存
组分 E：膜蛋白提取液 E	5ml	10ml	2-8℃保存
组分 F：膜蛋白提取液 F	10ml	20ml	2-8℃保存
组分 G：膜蛋白提取液 G	5ml	10ml	2-8℃保存

注：

1. 蛋白酶抑制剂未开盖使用前也可以2-8℃储存。开盖使用后-20℃储存。
2. 蛋白酶抑制剂在2-8℃低温时是固体状态，从冰箱取出后恢复至室温或37℃短时间水浴，变成液体状态后离心至管底部再开盖。
3. 试剂G为饱和溶液，有微量絮状物不影响使用，可在37℃短时间水浴，离心取上清使用或直接离心取上清使用。
4. 试剂拆封后请尽快使用完！

产品简介：

动物跨膜蛋白承担各种生物功能，在疾病的发生、发展过程中扮演重要角色。膜蛋白样品的制备需要充分考虑到与下游的胶分析及质谱分析等应用配套，因此膜蛋白样本制备成为一个难以逾越的挑战。

膜蛋白提取试剂盒是一种快速高效的高产膜蛋白提取试剂盒。本试剂盒提供全套试剂，适用于从动物细胞和动物组织提取总膜蛋白。提取过程简单方便，可在1小时内完成。提取的膜蛋白不仅纯度高，保持天然活性，而且绝少交叉污染。

本试剂盒含有的独特配方能够有效溶解细胞膜组份，包括细胞质膜、核膜和各种细胞器膜。本试剂盒含有的蛋白酶抑制剂混合物，阻止了蛋白酶对蛋白的降解，为提取高纯度的蛋白提供了保证。

本试剂盒的蛋白提取组份中不含有不可透析除去的去垢剂组份，不含 SDS、Triton X-100、chaps 等可能影响质谱实验的组份，基本可以满足下游任意的蛋白质组学相关实验研究。

本产品的蛋白酶抑制剂混合物中不含 AEBSF，可以避免由于AEBSF导致的质谱峰漂移，因此使用本产品提取的蛋白样品可以用于质谱(Mass Spectrometry, MS)检测和分析，蛋白质组学(proteomics)等相关研究。

本试剂盒中不含有EDTA，与金属螯和层析等下游应用兼容。

自备试剂和仪器：

离心机、振荡器、匀浆器、涡旋混匀器、移液器、冰箱、冰盒，PBS缓冲液、蛋白定量试剂盒，离心管、吸头、一次性手套

产品特点：

- 1、使用方便，从细胞，组织中提取蛋白不需经过研磨、反复冻融、超声破碎等前处理。
- 2、含蛋白稳定剂，提取的蛋白稳定。
- 3、紫外检测蛋白浓度时，背景干扰低。
- 4、蛋白酶抑制剂抑制了蛋白的降解，蛋白酶抑制剂配方优化。蛋白酶抑制剂混合物包含 6 种独立的蛋白酶抑制剂，每一种抑制剂可特异性抑制某一种或几种蛋白酶活性。该混合物优化的组成使其可以抑制几乎所有重要的蛋白酶活性，包括丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、丙氨酰-氨基肽酶等。

使用方法：

一、使用注意事项：

1. 正式实验前请选取几个样本做预实验，以优化实验条件，取得最佳实验效果
2. 螺旋盖微量试剂管装的试剂在开盖前请短暂离心，将盖和管内壁上的液体离心至管底，避免开盖时试剂损失。
3. 实验过程中的所有试剂须预冷；所有器具须放-20℃冰箱预冷。整个过程须保持样品处于低温。
4. 蛋白酶抑制剂储存期间溶液如果出现沉淀，不影响使用，溶解后正常使用。
5. 如果试剂盒不能短时间内用完，蛋白酶抑制剂混合物不可以一次全部加入提取液。
6. 提取液A在使用前须一直置于2-8℃条件，否则下游膜蛋白提取时会导致不容易分层。
7. 膜蛋白电泳时loading buffer应该避免煮沸。
8. 膜蛋白电泳时可以提高 loading buffer的SDS含量。
9. 禁止与其他品牌的试剂混用，否则会影响使用效果。
10. 样品或试剂被细菌或真菌污染或试剂交叉污染可能会导致错误的结果。

二、细胞膜蛋白提取：

1. 提取液制备：

每 500μl 冷的蛋白提取液 A 中加入 2μl 蛋白酶抑制剂混合物，混匀后置冰上备用。

每 500μl 膜蛋白溶解液 C 中加入 2μl 蛋白酶抑制剂混合物，混匀后置冰上备用。

2. 取 5-10×10⁶ 个以上细胞，在 4℃，500g 条件下离心 3-5 分钟，小心吸取培养基，尽可能吸干，收集细胞。
3. 用冷 PBS 洗涤细胞两次，每次洗涤后尽可能吸干上清。
4. 细胞样品中加入 400μl 冷的试剂 A，充分混匀。
5. 在 2-8℃条件下振荡 20-30 分钟，至细胞充分裂解，细胞沉淀明显减少。
6. 在 4℃，12000×g 条件下离心 5 分钟。
7. 将上清吸入另一干净离心管，在 37℃水浴 10 分钟。
8. 在 37℃，1000×g 条件下离心 5 分钟，此时溶液分为两层，下层是膜蛋白约为 50μl。

9. 小心移除上层液体，收集上层部分留作备用分析。
10. 用 850 μ l 冷的试剂 C 膜蛋白溶解液溶解下层膜蛋白部分，即得膜蛋白粗提液。
11. 在 900 μ l 膜蛋白粗提液样本中加入 100 μ l 试剂 E，充分混匀。
12. 冰浴或 4 $^{\circ}$ C 冰箱静置 30 分钟以上。
13. 在 4 $^{\circ}$ C，15000 \times g 以上条件下离心 15 分钟。
14. 小心移除上层清液丢弃，留沉淀。
15. 将离心管倒置在吸水纸上干燥离心管。
16. 加入 200 μ l 试剂 F 到离心管中。
17. 在 4 $^{\circ}$ C，15000 \times g 以上条件下离心 15 分钟。弃上清，留沉淀。
18. 将离心管倒置在吸水纸上干燥离心管。
19. 用 40-100 μ l 试剂 G 溶解蛋白沉淀，充分混匀。
20. 在 4 $^{\circ}$ C，10000 \times g 条件下离心 10 分钟。
21. 收集上清用于下游实验。
22. 将蛋白样品透析处理或者脱盐柱脱盐处理后用于下游实验。

常见问题分析：

1. 蛋白浓度低？

膜蛋白丰度比较低，在条件允许的情况下，需要尽可能加大细胞的上样量以提高膜蛋白浓度。

处理部分组织样本时可能没有裂解完全，导致蛋白浓度低。只要适当延长试剂A的处理时间即可。最好在持续振荡的条件下处理，没有振荡器也可间隔几分钟用吸头吹打混匀。

2. 用什么方法定量蛋白？

建议用BCA法。不适合用Bradford法，因为试剂A中含有干扰Bradford法的组份，导致定量不准。如果已经进行过透析处理或者用脱盐柱改换过缓冲体系，则可以用Bradford法定量。

3. 膜蛋白电泳没有条带？

膜蛋白样品通常浓度较低，电泳前一定要进行蛋白定量，以保证电泳是蛋白上样量足够。

膜蛋白提取好后，用溶解液充分溶解后，可以超声处理一下，再进行蛋白定量。

蛋白加Loading buffer后可以不用煮沸，采用50 $^{\circ}$ C保温30分钟。

蛋白Loading buffer中SDS终浓度含量可以提高至3%-10%。

有些样品的膜蛋白含量太低，可以使用丙酮沉淀膜蛋白，再使膜蛋白溶解于上样缓冲液中，一般可以跑出清晰的蛋白条带。

电泳时最好采用低电压低电流电泳。

膜蛋白丰度通常较低，有条件可以尝试用银染染色。

注意事项：

1. 本试剂盒仅供科学研究使用，不可用于诊断或治疗。
2. 最好使用一次性吸头、管、瓶或玻璃器皿，可重复使用的玻璃器皿必须在使用前清洗并彻底清除残留清洁剂。
3. 实验后完成后所有样品及接触过的器皿应按照规定程序处理。
4. 避免皮肤或粘膜与试剂接触。
5. 如果试剂不小心接触皮肤或眼睛，应立即用水冲洗。