

## 细胞膜蛋白提取试剂盒

### KP312 50次

#### 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	KP312
Buffer A	-20°C	25ml
buffer B	-20°C	2.5ml
固定液 A	-20°C	10ml

本试剂盒在所需温度储存 12 个月不影响使用效果。

#### 产品介绍:

试剂盒能够从哺乳动物新鲜或冻存的组织块、贴壁或悬浮细胞中制备细胞膜与胞内质膜组分。其独特的试剂成分与优化的制备方案使胞膜制备过程简单易行, 无需特殊设备和超速离心, 可在 1 小时内完成。应用本试剂盒制备的胞膜是细胞膜和细胞器膜如线粒体、内质网及质膜的混合物。制备得到的产物纯度可胜任后续的免疫沉淀、蛋白印迹、2-D gel、酶活性检测和受体分析等实验。

#### 操作步骤:

##### 1. 样本预处理:

**收集细胞:** 在每一次制备过程中, 使用等量的细胞数将明显提高后续检测结果的一致性, 因此建议在制备前对细胞准确计数。

**贴壁细胞:** 用 PBS 缓冲液冲洗细胞平皿, 用胰蛋白酶消化细胞。800g 离心 5-10 分钟, 弃上清, 用 PBS 缓冲液重悬洗涤细胞并再次离心收集细胞。

**悬浮细胞:** 800g 离心 5-10 分钟, 弃上清。用 PBS 缓冲液重悬洗涤细胞并再次离心收集细胞。

##### 2. 细胞匀浆裂解

**组织细胞匀浆裂解** : 向每  $1 \times 10^7$  个细胞或每 100 $\mu$ l (细胞离心后的体积) 细胞沉淀中加入 500 $\mu$ l Buffer A 试剂, 震荡重悬, 冰浴 2 分钟。将细胞悬液转移到冰预冷的玻璃匀浆器内, 在冰水浴中上下手动匀浆 20-30 次。

**注意**: 此破碎细胞步骤为关键环节。要使用 1-3ml 小容积玻璃匀浆器, 须选用间隙严密的研杵, 其特征是将研杵插入匀浆器套管后, 可提起研杵而套管不会脱落。有效研磨是上下推拉而不是旋转。破碎效果与细胞类型有关, 可在相差显微镜下检查, 未裂解细胞应小于 5%。

**组织块匀浆裂解**: 取 250mg 哺乳动物新鲜或  $-80^{\circ}\text{C}$  冻存组织块放入冰预冷的玻璃匀浆器内, 加入 500 $\mu$ l Buffer A 试剂。用研杵捣碎组织块, 上下手动匀浆 20 次, 冰浴 10 分钟, 然后上下手动匀浆 7 次。

**注意**: 与培养细胞特别是贴壁细胞相比, 组织块中的细胞在匀浆时较易破碎, 因而并非必须选择间隙严密的研杵。如果研杵与套管过于严密, 会使组织匀浆困难, 可选用研杵与套管稍松的匀浆器, 破碎效果与组织细胞类型有关, 可在相差显微镜下检查, 未裂解细胞应少于 5%。

### 3. 粗提物制备:

取约 500 $\mu$ l 裂解物, 转移到新的离心管中, 800g,  $4^{\circ}\text{C}$  离心 5 分钟。上清为胞膜-胞浆混合物。

### 4. 胞膜胞浆制备:

- a. 将步骤三获得的上清转移到新的离心管中, 估计上清的体积。
- b. 加入上清液 1/10 体积的 Buffer B 与上清液混合, 冰浴 5 分钟。
- c. 14,000rpm,  $4^{\circ}\text{C}$  离心 30 分钟。
- d. 沉淀为胞膜组分, 含有细胞膜和亚细胞器碎片, 可短暂离心除尽液体, 用 50-100 $\mu$ l 固定液 A 重悬备用或用 RIPA 裂解胞膜; 做 WB 时膜蛋白分子量 100KD 以上的建议用较强的蛋白提取试剂如加强的 RIPA, 便于获取溶解度低的膜蛋白, 具体方案根据试验目的确定。

**说明**: 固定液 A 不含去垢剂, 重悬于固定液 A 中的胞膜或胞核组分呈不溶解状态是正常的, 用户可用自备溶液重悬胞膜或胞核成分。如果进行蛋白印迹、2-D get 等实验, 用户可用 SDS 上样缓冲液直接裂解细胞膜或细

胞核成分。对于进行免疫共沉淀实验来说，可用 RIPA 裂解液重悬胞膜。试剂盒各组分中未添加蛋白酶抑制剂，可自行选择添加。