Orders ■ 400-6123-828
orders@ab-mart.com
Web ■ www.ab-mart.com.cn

产品介绍

该产品为一款总膜蛋白提取试剂盒，快速且可重复的方法，基于温度依赖的相分离，制备高度富集膜蛋白和疏水蛋白。

膜蛋白提取流程：

1. 细胞准备

常规动物培养细胞在本流程下膜蛋白得率约为：2-4 mg/1x10^8细胞，建议操作细胞量>1x10^7细胞。细胞可在贴壁培养或悬浮培养下至活性浓度，一般为接近但未达饱和密度，例如80%满的贴壁密度，悬浮细胞约在1-2x10^6/ml。过高的培养密度会导致死细胞增多，在蛋白提取过程中引入更多的碎片污染，例如DNA纤维沉淀。悬浮培养细胞在提取前离心去上清，1xPBS洗2遍去除培养基后重悬于1xPBS并计数备用，计数时需要使用肽酚蓝检测活细胞比例>90%。贴壁细胞使用胰酶或其它解离方法解离为单细胞悬液，一般推荐1xPBS含1mM EDTA 37°C处理10 min以上（不同细胞处理时间有差异）以减小对膜蛋白组的影响，细胞悬液以与悬浮培养细胞的方式洗涤与重悬计数备用。

2. 溶液准备

2.1 自备溶液：1x PBS，500mM EDTA（与1xPBS 1:500稀释制备细胞解离液用）
2.2 胞浆蛋白释放缓冲液A【适用大多数培养细胞，部分细胞系对缓冲液A较为敏感，在缓冲液A处理下会释放较多的DNA污染，表现为在缓冲液A处理下，溶液中会出现较多絮状DNA沉淀，导致包裹为细胞团，影响提取效率与产生污染，出现这种情况时使用胞浆蛋白释放缓冲液B】；
2.3 胞浆蛋白释放缓冲液B（A液备选）；
2.4 缓冲液C；
2.5 蛋白酶抑制剂（货号：A10004，200×）

3. 膜蛋白提取流程

3.1 预先在需要使用到的缓冲液A/B和缓冲液C中加入蛋白酶抑制剂（A10004）混匀，各缓冲液4°C保存。
3.2 1x PBS重悬并计数好的细胞 1000 g离心5 min，弃上清。
3.3 立即按 2ml/ 1x10^7细胞比例加入胞浆蛋白释放缓冲液A或B，充分混匀，在4°C冰浴下摇床温和混匀10 min。细胞系首次实验可先使用缓冲液A液，如果在A液中出现显著絮状DNA释放，则需要更改为缓冲液B液。缓冲液A的加样比例根据细胞大小可作调整，一些血液来源细胞系细胞体积较小，与常规贴壁细胞系有明显差异，缓冲液A量可根据细胞体积差异与离心后的沉淀体积调整，例如人B细胞与T细胞来源细胞系，细胞体积可为常规贴壁细胞的1/10以下，缓冲液A可用到2 ml/1x10^8细胞。
3.4 14,000 rpm 4°C离心10 min，收集上清为胞浆蛋白提取液，沉淀按 0.2 ml/1x10^7细胞比例加缓冲液C，吹打混匀后，4°C摇床温和混匀30 min。
3.5 14,000 rpm 4°C离心10 min，收集上清为即为胞膜蛋白提取液。
3.6 上述收集的各蛋白组分进行蛋白定量，推荐氨基黑法，或稀释5倍以上用Bradford法测定。
3.7 膜蛋白富集质检：各蛋白提取上清组分，制备为SDS蛋白裂解液，推荐蛋白浓度1 mg/ml以上，在SDS上分离后分别以，1）考染检测蛋白完整性，条带分布均匀，无特别高丰度组分蛋白富集；2）WB检测膜蛋白富集与其它组分污染，推荐使用膜蛋白内参抗体 ATPB Mouse Antibody（货号M40013）或者Sodium Potassium ATPase Rabbit Antibody（货号T40109）检测膜蛋白富集情况，使用β-Tubulin(C66)Mouse Antibody（货号M20005）检测胞浆蛋白污染，使用Histone H3.1 Rabbit Antibody（货号P30266）检测核蛋白污染。

For *in vitro* research use only and not intended for use in humans or animals.

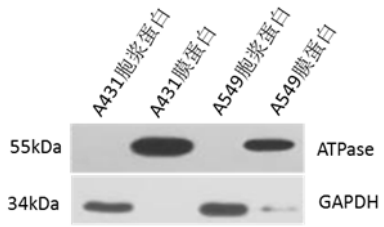
#A10008
膜蛋白提取试剂盒

□ 50T

Orders ■ 400-6123-828
orders@ab-mart.com
Web ■ www.ab-mart.com.cn

动物细胞蛋白参考得率

	用量	蛋白浓度	蛋白总量	蛋白得率
Cells	1x10^7			
浆蛋白（缓冲液 A/B）	2 ml	1-2 mg/ml	2-4 mg	2-4 mg/10^7细胞
膜蛋白（缓冲液 C）	0.2 ml	1-2 mg/ml	0.2-0.4 mg	0.2-0.4 mg/10^7细胞



注意事项

1. 常规膜蛋白提取方法，包括其它友商类似的提取试剂盒均无法做到提取蛋白为完全的细胞外膜蛋白组成，因此以试剂盒方式主要目的为膜蛋白富集，以增加低丰度膜蛋白在后续实验中的检出概率，例如在全细胞表达水平极低，甚至在细胞膜表面表达也相对低的受体蛋白，如GPCR蛋白等。
2. 膜溶解后细胞中绝大多数核膜外组分消失，因此现主要的膜蛋白提取试剂盒均会有细胞内其它膜组分污染，例如线粒体、ER、高尔基体等，这些细胞器的膜组成与细胞外膜的差异不易以试剂方式实现分离，高纯度的细胞外膜蛋白、或细胞器蛋白提纯需要常规的密度梯度离心等方法辅助实现。
3. 细胞核来源蛋白是膜蛋白试剂盒提取方法的主要污染组分之一，在胞膜溶解前与溶解后可以辅助DNA DAPI染色检测核完整性，需要大部分的细胞核有明亮完整的核染色，一般情况下还可以看到核仁结构。有破损的细胞核，染色暗淡，丢失核内亚结构特征。且在处理过程中可看到较明显的絮状沉淀，足以干扰细胞间分散。如发生大量核损伤，需要留意控制细胞活性，操作过程中要温和操作减小细胞损伤。部分细胞系核膜稳定性低，主要为一些血液与免疫系统来源细胞，也不易实现与细胞膜系统，使用试剂盒方法时，膜蛋白富集与纯化程度会略有降低。
4. 良好的膜蛋白提取操作过程，膜蛋白与细胞浆蛋白总量比大约是1/10，可接受的富集程度约在1/10-1/5，如果比率高于1/5，则富集效果不佳。可尝试：1）提高胞浆蛋白释放缓冲液的用量，确保胞浆蛋白的充分释放；2）使用胞浆蛋白释放缓冲液A。
5. 细胞油脂含量较高时，蛋白提取液中会存在难以离心分离的白色悬浊上层，取样时可小心避开，或使用0.44um滤器过滤去除。
6. 本试剂盒不直接适合于有胞壁细胞与组织样本的膜蛋白提取，如需处理有胞壁细胞样本或组织样本可：1）蛋白酶或纤维素酶等胞壁降解酶预处理，去除细胞壁后，按常规动物细胞的方式提取；2）动物组织样本可用胶原酶等蛋白酶预处理为单细胞悬液、植物组织可用纤维素酶、果胶酶等酶预处理为原生质体，或动物组织可用玻璃匀浆器小心分离出细胞后按常规动物细胞的方式提取。组织样本的膜蛋白富集程度与纯度均会有所下降。

For *in vitro* research use only and not intended for use in humans or animals.