

# 蛋白质系列

CAT#:91204A-50

CAT#:91204B-50

常温运输及保存

**TIANDZ**

## 动植物膜蛋白提取试剂盒

Animal-Plant Membrane Protein Isolation Kit

使用手册 V1.0

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: [www.tiandz.com](http://www.tiandz.com); 电话: 400-6765278; 电邮: [order@tiandz.com](mailto:order@tiandz.com)

<p><b>产品及特点</b></p>	<p>细胞膜蛋白质参与了很多重要的细胞活动，根据它们与膜结合的位置一般分为两种，一种是附着在细胞膜上，另一类是嵌入到细胞膜中间。附着型膜蛋白疏水性较弱，比较容易提取和纯化；而嵌入型膜蛋白疏水性很强，所以在水溶液里面很难溶解，非常难以提取和纯化。天恩泽基因根据上述特点，经过精心优化的、开发出本产品，专门用于分离纯化这两种膜蛋白。它具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 两步法提取，先纯化含膜组分，再分离附着型膜蛋白和嵌合型膜蛋白。</li> <li>2. 膜蛋白（附着型+嵌入型）产量高，对肝脏组织而言，其线粒体膜蛋白产率为 10 ug/mg 左右，过氧化物酶体为 1 ug/mg 左右，内质网为 25-30 ug/mg。</li> <li>3. 所得的膜蛋白大部分具有生物活性，可用于活性研究。</li> <li>4. 可用动物、植物培养细胞和实体细胞为材料，也可用预先纯化的含膜组分或细胞器（如线粒体、叶绿体、内质网、过氧化物酶体）为材料（本试剂盒不含纯化细胞器的试剂）。</li> <li>5. 本方法重复性好。</li> <li>6. 本试剂盒足够 50 次微量提取，分 A 型和 B 型两种。A 型用于附着型膜蛋白，B 型用于嵌合型膜蛋白和附着型膜蛋白。</li> </ol>																								
<p><b>规格及成分</b></p>	<table border="1" data-bbox="592 1178 1310 1514"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>编号</th> <th>A 型小纸盒包装</th> <th>B 型小纸盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>溶液 A</td> <td>91204A</td> <td>100 mL</td> <td>100 mL</td> </tr> <tr> <td>溶液 B</td> <td>91204B</td> <td>10 mL</td> <td>10 mL</td> </tr> <tr> <td>溶液 C</td> <td>91204C</td> <td>50 mL</td> <td>100 mL</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>91204sc</td> <td>1 份</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>					成分	编号	A 型小纸盒包装	B 型小纸盒包装	溶液 A	91204A	100 mL	100 mL	溶液 B	91204B	10 mL	10 mL	溶液 C	91204C	50 mL	100 mL	使用手册	91204sc	1 份	1 份
成分	编号	A 型小纸盒包装	B 型小纸盒包装																						
溶液 A	91204A	100 mL	100 mL																						
溶液 B	91204B	10 mL	10 mL																						
溶液 C	91204C	50 mL	100 mL																						
使用手册	91204sc	1 份	1 份																						
<p><b>运输及保存</b></p>	<p>常温运输及保存，有效期一年。</p>																								
<p><b>自备试剂</b></p>	<p>PBS，电泳上样液。</p>																								
<p><b>使用方法</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1、对培养细胞：收集 <math>1 \times 10^7</math> 个培养细胞（动物细胞、植物细胞），用 20 mL 自备的冰浴的 PBS 洗涤三次，每次洗涤后需要 4℃ 下 1000 g 离心 2 分钟，然后小心弃上清。对实体组织：由于各种动植物的各种实体组织的属性差别太大，故本手册的纯化膜组分的操作步骤（第 1-7 步）不一定完全适合，用户需要自行优化以纯化含膜组分或含膜的细胞器（如细胞质膜、内质网、线粒体、叶绿体等），再将含膜组分或细胞器沉淀直接用于第 8 步的膜蛋白提取。</li> </ol>																								

- 2、 将洗涤后的细胞沉淀重悬在 2 mL 溶液 A 中，冰上静置 10 分钟。注意：膜蛋白有膜的保护，在纯化过程中对蛋白酶的降解没有胞浆蛋白敏感，一般可以不加蛋白酶抑制剂。但如果纯化的膜蛋白的确有降解的话，可以在溶液 A 中加入自备的蛋白酶抑制剂混合物。
- 3、 转移到容积为 2 mL 的 Dounce 玻璃匀浆器上下匀浆 20-50 次（具体次数取决于细胞种类，293T 细胞一般需要 20 次左右，而 MEF 细胞一般需要 50 次左右。最好用样品先进行预实验以摸索最佳匀浆次数，最佳匀浆次数时在显微镜下能看见细胞破裂但细胞核完整）。
- 4、 将匀浆液转移到 15 或 50 mL 塑料管中，加入相当于匀浆液体积 1/10 的溶液 B，其间可以轻柔颠倒混匀 3-5 次，留少量样品作为对照 1（匀浆液）。
- 5、 4℃ 2500 rpm 离心 20 分钟，沉淀为细胞核，上清为胞浆和膜成分，留少量样品作为对照 2（胞浆和膜成分）。
- 6、 将上清液用 Beckman Optima 台式超速离心机 100,000 g 4℃离心 60 分钟。也可以使用其他冷冻超速离心机，但离心力应该为 100,000g，否则有可能得不到膜成分沉淀。
- 7、 小心转移上清（胞浆部分）并留少量样品作为对照 3（胞浆）。
- 8、 将沉淀（含膜组分）重悬于 1 mL 冰浴的溶液 C 中后，冰上静置 30 分钟，留少量样品作为对照 4（膜成分）。本成分电泳前，需要先用自备的 TCA 沉淀（TCA 终浓度为 10%），再用冰冷的丙酮洗涤两次后再溶解在 1×上样液中待用。对照 1-3 号不需要这样的预处理。
- 9、 用 Beckman Optima 台式超速离心机 100,000g 4℃离心 60 分钟。也可以使用其他冷冻超速离心机，但离心力应该一致，否则有可能得不到沉淀。
- 10、 如果需要附着型膜蛋白，则取上清（含附着型膜蛋白）弃沉淀（含膜和其中的嵌合型膜蛋白）。上清可以放-20℃长期保存，如果需要电泳，需要先用自备的 TCA 沉淀（TCA 终浓度为 10%），再用冰冷的丙酮洗涤两次后再溶解在 1×上样液中与对照 1-4 号一起上样电泳。
- 11、 如果需要嵌合型膜蛋白，则取出上清（含附着型膜蛋白）并留少量样品作为附着型膜蛋白样品，然后再用 1 mL 冰浴的溶液 C 重悬沉淀，然后 100,000g 4℃离心 60 分钟，去掉上清（上清含残留的附着型膜蛋白，可以留样作为洗涤后的附着型膜蛋白样品）。沉淀含膜和其中的嵌合型膜蛋白。如果需要测定膜蛋白的浓度，则将其溶解在自备的 0.5 M NaOH 溶液