

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:100929-50

常温运输和保存, DNase I 需低温保  
存

**TIANDZ**

## 细菌细胞膜蛋白提取试剂盒

Bacterial Membrane Protein Isolation Kit

使用手册 V1.1

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>本试剂盒是基于超速离心的快速提取细菌膜蛋白的试剂盒。其原理是裂解细胞后，通过超速离心分离出细胞膜和附着的蛋白质。跟传统的密度梯度离心法和去污剂法相比，本方法具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 一步式分离细胞膜和膜蛋白，密度梯度离心法简单快捷。</li> <li>2. 膜蛋白纯度高，能够去除各种胞浆蛋白的污染，也能去除松散附着在细胞膜上的蛋白，所得膜蛋白主要是整合蛋白。</li> <li>3. 膜蛋白完整性好，主要是由于实际中有抑制蛋白酶成分。</li> <li>4. 回收效率高，一般能得到相当于总蛋白量 6%的膜蛋白。</li> <li>5. 可用于 <i>E. coli</i>, <i>S. typhimurium</i>, <i>K. aerogens</i>, <i>P. aeruginosa</i>, <i>C. crescentus</i> 等细菌。</li> </ol>  |        |  |    |    |       |               |         |        |               |         |       |               |         |        |            |        |        |      |          |     |
|---------------------|--|--------|--|----|----|-------|---------------|---------|--------|---------------|---------|-------|---------------|---------|--------|------------|--------|--------|------|----------|-----|
| <p><b>规格及成分</b></p> | <table border="1" data-bbox="584 775 1267 1171"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>编号</th> <th>大扁盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>细菌细胞膜蛋白提取溶液 A</td> <td>100929a</td> <td>125 mL</td> </tr> <tr> <td>细菌细胞膜蛋白提取溶液 B</td> <td>100929b</td> <td>25 mL</td> </tr> <tr> <td>细菌细胞膜蛋白提取溶液 C</td> <td>100929c</td> <td>250 mL</td> </tr> <tr> <td>DNase I 干粉</td> <td>131230</td> <td>3.5 mg</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>100929sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>                       |        |  | 成分 | 编号 | 大扁盒包装 | 细菌细胞膜蛋白提取溶液 A | 100929a | 125 mL | 细菌细胞膜蛋白提取溶液 B | 100929b | 25 mL | 细菌细胞膜蛋白提取溶液 C | 100929c | 250 mL | DNase I 干粉 | 131230 | 3.5 mg | 使用手册 | 100929sc | 1 份 |
| 成分                  | 编号   | 大扁盒包装  |  |    |    |       |               |         |        |               |         |       |               |         |        |            |        |        |      |          |     |
| 细菌细胞膜蛋白提取溶液 A       | 100929a  | 125 mL |  |    |    |       |               |         |        |               |         |       |               |         |        |            |        |        |      |          |     |
| 细菌细胞膜蛋白提取溶液 B       | 100929b  | 25 mL  |  |    |    |       |               |         |        |               |         |       |               |         |        |            |        |        |      |          |     |
| 细菌细胞膜蛋白提取溶液 C       | 100929c  | 250 mL |  |    |    |       |               |         |        |               |         |       |               |         |        |            |        |        |      |          |     |
| DNase I 干粉          | 131230   | 3.5 mg |  |    |    |       |               |         |        |               |         |       |               |         |        |            |        |        |      |          |     |
| 使用手册                | 100929sc   | 1 份    |  |    |    |       |               |         |        |               |         |       |               |         |        |            |        |        |      |          |     |
| <p><b>运输及保存</b></p> | <p>常温运输和保存，但 DNase I 需要低温运输，-20℃保存。有效期一年。</p>  |        |  |    |    |       |               |         |        |               |         |       |               |         |        |            |        |        |      |          |     |
| <p><b>自备试剂</b></p>  | <p>膜蛋白溶解液（取决于后续实验。如果后续实验为 SDS-PAGE，则用 1× SDS-PAGE 上样液作为溶解液；如果用于 2D 电泳，则使用 1×等电点电泳上样液作为溶解液）。</p>  |        |  |    |    |       |               |         |        |               |         |       |               |         |        |            |        |        |      |          |     |
| <p><b>使用方法</b></p>  | <p><b>准备：</b>第一次使用本试剂盒时需要将所有 DNase I 干粉倒入溶液 B 中，轻柔颠倒使 DNase 干粉溶解。未用完的部分需要放-20℃保存，最好在一个月内完，否则 DNase 将逐渐失去活性。此外，最好在实验前 1 小时将溶液 B 冰浴预冷。</p> <p><b>用法一：小量制备（主要用于上样量比较小的 SDS-PAGE 电泳等实验）</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1、 收集 20-40 mL 过夜培养的细菌饱和培养液(OD420 在 1.5 左右即可),2500 g 室温离心 10 分钟后弃上清。</li> <li>2、 加入 2 mL 溶液 A，轻柔吹打，将细菌重悬于溶液 A 中。</li> <li>3、 2500 g 室温离心 10 分钟后弃上清。</li> <li>4、 加入 0.5 mL 溶液 B（必须已经提前加入了 DNase I 干粉），轻柔吹打使细菌重悬。注：如果细菌起始量没有 20-40 mL，溶液 A 的用量可以等比例降低。</li> </ol> |        |  |    |    |       |               |         |        |               |         |       |               |         |        |            |        |        |      |          |     |

重悬在溶液 A 中的细菌可以放-80℃长期保存。

- 5、用超声或 French Press 方法裂解细胞。如果用 French Press 方法，则需要处理至少两次，每次的压力为  $9.65 \times 10^7$  (=14000 psi)。注意：不论用哪种裂解方法，都必须在显微镜下检查细菌是否已经裂解，否则还需要重复细菌裂解过程，直到 80%以上的细菌都裂解为止。
- 6、2500g 室温离心 8 分钟后小心转移上清到新的 10 mL-15 mL 塑料离心管中（如 Beckman Optima 台式超速离心机离心管），弃沉淀（未破裂细胞）。
- 7、在上清（细菌裂解液）中加入 5 mL 预冷的溶液 C，轻柔颠倒混匀后冰浴放置 30-60 分钟。其间可以轻柔颠倒混匀 3-5 次。
- 8、用 Beckman Optima 台式超速离心机 115,000g 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。
- 9、小心移弃上清，在沉淀中加入 0.2 mL 溶液 A，充分吹打混匀。
- 10、用 Beckman Optima 台式超速离心机 115,000g 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。
- 11、小心移弃上清，所得沉淀放-20℃长期保存，也可以直接加入 0.1 mL 自备的，跟后续实验兼容的缓冲液（如 1×SDS-PAGE 上样液中，可从本公司购买），所得膜蛋白的浓度将在 1mg/mL 左右。

#### **用法二：大量制备（主要用于上样量比较大的 2D 电泳等实验）**

- 1、收集 200-400 mL 过夜培养的细菌饱和培养液（OD420 在 1.5 左右即可），2500 g 室温离心 10 分钟后弃上清。
- 2、加入 20 mL 溶液 A，轻柔吹打，将细菌重悬于溶液 A 中。
- 3、2500 g 室温离心 10 分钟后弃上清。
- 4、加入 5 mL 溶液 B（必须已经提前加入了 DNase I 干粉），轻柔吹打使细菌重悬。注：如果细菌起始量没有 200-400 mL，溶液 A 的用量可以等比例降低。  
重悬在溶液 A 中的细菌可以放-80℃长期保存。
- 5、用超声或 French Press 方法裂解细胞。如果用 French Press 方法，则需要处理至少两次，每次的压力为  $9.65 \times 10^7$  (=14000 psi)。注意：不论用哪种裂解方法，都必须在显微镜下检查细菌是否已经裂解，否则还需要重复细菌裂解过程，直到 80%以上的细菌都裂解为止。
- 6、2500g 室温离心 8 分钟后小心转移上清到干净的玻璃烧杯中，弃沉淀（未破裂细胞）。
- 7、在上清（细菌裂解液）中加入 50 mL 预冷的溶液 C，轻轻在冰浴中搅拌混匀 30-60 分钟。注：可以在大烧杯中装冰，然后将装有样品的小烧杯放入，在放

|             |  |
|-------------|--|
|             | <p>入干净的搅拌子，以最低速度搅拌。</p> <p>8、用 Beckman Type 55.2 Ti 转头 115,000g 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。</p> <p>9、小心移弃上清，在沉淀中加入 2 mL 溶液 A，充分吹打混匀。</p> <p>10、用 Beckman Type 55.2 Ti 转头 115,000g 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。</p> <p>11、小心移弃上清，所得沉淀放-20℃长期保存或溶解在 1 mL 自备的，跟后续实验兼容的缓冲液（如 1×等电点电泳上样液，可从本公司购买），所得膜蛋白的浓度在 1mg/mL 左右。</p> |
| <b>相关产品</b> | 动植物膜蛋白微量制备试剂盒 (CAT#:91204-50)  |