



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

http:// www.real-times.com.cn

E-mail: real-times@vip.163.com

动物膜蛋白提取试剂盒（细胞样品） (Animal Membrane Protein Extraction Kit for Cells)

Ver.731071

产品货号	名称	规格
RTD8111	动物细胞膜蛋白提取试剂盒（细胞样品）	50 次

● 产品简介

动物膜蛋白提取试剂盒（细胞样品）(Animal Membrane Protein Extraction Kit for Cells) 提供了一种简便地从培养细胞或贴壁细胞中提取膜蛋白的方法。提取的膜蛋白不仅包括质膜上的膜蛋白，也包括细胞器膜如线粒体膜、内质网膜和高尔基体膜上的膜蛋白。

本产品与许多用于分离膜蛋白的程序不同，该试剂盒不需要超声，不需要耗时的超速离心，不使用去垢剂，最大限度地保持了膜蛋白在细胞内的原始状态。提取的基本原理是通过提取溶液和离心柱的协调作用提取得到高纯度的膜蛋白。膜蛋白提取溶液可以温和作用于细胞膜，改变细胞的渗透压，然后在高速离心下细胞通过离心柱，这个过程中细胞膜会破裂；收集液 700 g 低速离心分离去除细胞核，因此消除了膜组分中细胞核组份的污染；随后上清使用常规台式低温离心机（无需超速离心）16000 g 高速离心，沉淀即为膜蛋白。

该产品约 60 分钟即可完成培养细胞膜蛋白的提取。膜蛋白是在温和、非变性条件下提取的，结合不同的溶解液，溶解后的膜蛋白可以用于 SDS-PAGE 变性电泳检测、Blue Native 非变性电泳检测以及等电聚焦电泳等。另外，膜蛋白也可以用于酶活性测定，免疫沉淀，ELISA 测定等。

对于细胞样品，如果每次使用细胞的数量为 $2-5 \times 10^6$ ，本试剂盒可以提取 125 个样品；如果每次使用的细胞数量为 1×10^7 细胞，本试剂盒可以提取 50 个样品。

● 产品组成

序号	产品编号	名称	规格	贮存
1	RTD8111-01	膜蛋白提取溶液	25 ml	4℃
2	PS1020	变性蛋白溶解液	5 ml	RT
3	PN1020	膜蛋白重悬液（BN 电泳用）	5 ml	4℃
4	DM1080	膜蛋白增溶液 A	5 ml	4℃； 配制后-20℃贮存
5	PL130-01	10×膜蛋白 A 型上样缓冲液（配套膜蛋白增溶液 A 使用）	1 ml	4℃
6	CD-50	离心柱套装 （包含离心柱和 2ml 连盖收集管）	50 套	RT
		说明书	-	

● 贮存、效期和运输：

根据标签温度贮存；一年有效；试剂盒常温运输。

● 用前必读:

1. 离心机请调整成 RCF/g 模式, 按照离心力设置离心机 (不要根据转速 rpm 模式设置), 所有离心步骤都需要在 4°C 低温离心机中进行。
2. 将膜蛋白提取溶液混匀后放置于冰上。将离心柱套入 2 ml 连盖收集管中, 盖好管盖, 放置于冰上预冷。
3. 蛋白提取推荐添加蛋白酶抑制剂 (自备, 试剂盒不提供), 根据蛋白酶抑制剂母液浓度提前添加在膜蛋白提取溶液中 (如抑制剂母液是 100×, 添加时按照 1:100 添加, 即 1ml 膜蛋白提取溶液添加 10μl 抑制剂)。研究蛋白磷酸化, 需要添加磷酸酶抑制剂 (自备, 试剂盒不提供)。
4. 蛋白定量推荐使用 BCA 方法, 可以选择 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (货号: RTP7102)。

● 使用方法:

一 培养细胞膜蛋白提取:

1.1 准备溶液:

混匀膜蛋白提取溶液, 立即放置在冰上。取适当量的溶液, 在使用前数分钟内加入蛋白酶抑制剂 (自备, 试剂盒不提供), 随后立即放于冰上待用。按照下表大体估算膜蛋白提取溶液使用体积:

细胞类型	培养器皿	细胞数量	细胞沉淀体积(PCV)(μl)	膜蛋白提取溶液(μl)
悬浮细胞		2-5×10 ⁶	20-50	200
		5-10×10 ⁶	>50	500
贴壁细胞	96 孔板	~1×10 ⁵	调整细胞数目到 2-5×10 ⁶	200
	24 孔板	~5×10 ⁵	调整细胞数目到 2-5×10 ⁶	200
	6 孔板	~2.5×10 ⁶	~25	200
	25cm ² 培养瓶	~2×10 ⁶	~20	200
	75cm ² 培养瓶	~8×10 ⁶	~80	500
	35 mm 培养皿	~2×10 ⁶	~20	200
	60 mm 培养皿	~5×10 ⁶	~50	500
	100 mm 培养皿	~1.5×10 ⁷	调整细胞数目到 2-5×10 ⁶	200

注: (二百万, 2×10⁶)HeLa 细胞, 其细胞沉淀体积 (PCV, Packed Cell Volume) 大约为 20 μl。

1.2 准备细胞:

1.2.1 对于贴壁细胞: 细胞用 PBS 漂洗一遍, 弃 PBS; 再加入适量 PBS, 用细胞刮刀刮下细胞, 或用 0.02% EDTA (0.5 mM) 溶液处理细胞使细胞不再贴壁很紧, 并用移液器吹打下细胞。400 g (~2000 rpm) 4°C 离心 5 min 收集细胞, 尽最大努力吸尽上清, 留下细胞沉淀备用。尽量避免用胰酶消化细胞, 以免胰酶降解需提取的目的蛋白。

1.2.2 对于悬浮细胞: 400 g (~2000 rpm) 4°C 离心 5 min 收集细胞, 用 PBS 洗一遍,

离心收集细胞，尽最大努力吸尽上清，留下细胞沉淀备用。

1.3 裂解细胞膜：

1.3.1 细胞沉淀中加入准备好的膜蛋白提取溶液（含蛋白酶抑制剂），用移液器吹打重悬细胞沉淀，**涡旋剧烈震荡 30-60 秒，冰浴处理 10 分钟**，间歇 2-3 混匀。

注：提取溶液使用推荐经验值：起始细胞数低于 5×10^6 加入 200 μl 提取溶液，起始细胞数量 $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ 加入 500 μl 提取溶液。如果细胞数目低于 1×10^6 或高于 1×10^7 ，建议调整细胞数目在 $2 - 5 \times 10^6$ 范围内。

1.3.2 将细胞悬液转移到离心柱中，盖上管盖，16,000 g (~13000 rpm) 4°C 离心 1 分钟，离心后收集管底部会有沉淀形成。

注：离心柱最大体积为 600 μl ；**确保离心机可以在 10 秒内达到 16000 g。**

1.3.3 弃去离心柱，盖好 2 ml 收集管管盖，用 1ml 移液器轻柔吹打重悬收集管中的沉淀。

1.4 去除细胞核：

溶液 700 g (~2700 rpm) 4°C 离心 1 分钟，用 200 μl 吸头小心将上清（上清稍有浑浊）转移到新的 1.5 ml 离心管中。注意：转速不要超过 700g，否则会降低膜蛋白的得率。

关键步骤：**吸取上清时不要触及沉淀，甚至可以丢弃部分上清不吸取，以免上清（含膜蛋白）中污染核蛋白。如果使用 200 μl 提取溶液，建议吸取 150 μl 上清；使用 500 μl 提取溶液，建议吸取 400 μl 上清。**此步骤得到的细胞核纯度不高，混杂有没有完全破碎的完整细胞，不建议用于相关实验。

1.5 沉淀膜蛋白：

上清溶液 16000 g (~13000 rpm) 4°C 离心 30 分钟，用 200 μl 吸头吸弃上清，沉淀即为提取的膜蛋白。上清是胞浆蛋白，如需要可保存备用。

关键步骤：**此步骤必须完全将上清吸取干净，可以分次吸取上清，最后用 10 μl 吸头将残余上清彻底吸净，以免膜蛋白中污染胞浆蛋白。**

二 膜蛋白溶解：

膜蛋白沉淀可以根据下游实验需求用 50 μl 相应溶解液溶解。

注：不建议加入超过 50 μl 溶解液，会导致蛋白浓度偏低。

2.1 膜蛋白变性样品处理：

2.1.1 建议使用 50 μl 变性蛋白溶解液（货号：PS1020）溶解膜蛋白；

2.1.2 BCA 方法测定蛋白浓度；

2.1.3 用变性蛋白溶解液调整蛋白浓度为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，按需分装，每管 50 μl ，-80°C 保存待用；

2.1.4 取一管 50 μl 样品加入 SDS-PAGE 上样缓冲液（货号：PL080，PL113，PL121）处理，建议调整上样液浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ；对于多次跨膜蛋白（Multi-pass membrane protein）的变性电泳检测，**样品建议使用 37°C 处理 30 分钟或者 70 度处理 10 分钟**，不要 95°C 加热 5 分钟，因为在 95°C 高温情况下，多次跨膜蛋白极易聚集形成多聚体，样品会聚集，WB 检测会表现为比实际蛋白大小更大的分子量；

2.1.5 使用 SDS-PAGE 凝胶（货号：RTD6132, RTD6116）电泳，每个泳道上样 10-40 μ l（5-20 μ g）。

2.2 膜蛋白 BN 非变性样品处理：

2.2.1 建议使用 50 μ l 膜蛋白重悬液（BN 电泳用）（货号：PN1020）重悬膜蛋白沉淀；

2.2.2 BCA 方法测定蛋白浓度（货号：RTP7102）；

2.2.3 用膜蛋白重悬液（BN 电泳用）调整蛋白浓度为 1 μ g/ μ l，按需分装，每管 50 μ l，-80 $^{\circ}$ C 保存待用；

2.2.4 取一管 50 μ l 样品，溶化混匀后 4 $^{\circ}$ C 16000 g 5 分钟，去除上清，保留沉淀；

2.2.5 沉淀中加入 50 μ l 膜蛋白增溶液 A（货号：DM1080），轻柔重悬沉淀，尽量不产生气泡，冰浴 10 分钟；

膜蛋白增溶液 A 配制方法：在增溶剂粉末管中加入 2.5 ml 溶解缓冲液，加入超纯水精准定容至 5 ml，彻底混匀，增溶液中 DDM 终浓度为 1%。

2.2.6 4 $^{\circ}$ C 16000 g 15 分钟，取上清至一干净 1.5 ml 离心管中即为增溶后膜蛋白溶液（小心不要吸取沉淀），此时得到的膜蛋白浓度为 1 μ g/ μ l，其中去垢剂 DDM（n-Dodecyl β -D-maltoside, β -DM n-十二烷基- β -D-麦芽糖苷）终浓度为 1%；

2.2.7 膜蛋白溶液中加入 1/10 体积 10 \times 膜蛋白 A 型上样缓冲液（配套膜蛋白增溶液 A 使用）（货号：PL130），使用 BN 凝胶电泳（货号：RTD6139, RTD6140），每个泳道上样 5-20 μ g。

2.3 膜蛋白等电聚焦样品处理（2D 凝胶第一维电泳）：

建议膜蛋白沉淀中使用溶解液：7 M 尿素, 2 M 硫脲, 2%CHAPS, 20mM DTT(自备，试剂盒不提供)。

三 关于膜蛋白产量和质量的评价：

3.1 膜蛋白产量：

细胞系	细胞数量	膜蛋白
K562	1×10^7	50-80 μ g
Jurkat	1×10^7	80-100 μ g
Hela	1×10^7	100-150 μ g
NIH-3T3	1×10^7	80-120 μ g

3.2 膜蛋白质量评价：

膜蛋白质量评价首先看提取的蛋白是否是膜蛋白，其次要看膜蛋白是否有明显的富集，其三要看的膜蛋白是否有其他组分交叉污染，最后看提取的膜蛋白中是否可以检测出目的蛋白。使用专门的膜内参检测（下表），可以初步确认提出的是膜蛋白。膜蛋白是否有效富集需要用总蛋白作为对照，与总蛋白相比，膜蛋白中膜蛋白内参是否有明显富集。膜蛋白中的交叉污染可以用其他组分内参检测膜蛋白样品，如关注膜蛋白中是否有细胞核蛋白污染，可以使用核蛋白内参如 Lamin B1 检测膜蛋白，检测无条带即说明膜蛋白与细胞核组分无交叉污染。用目

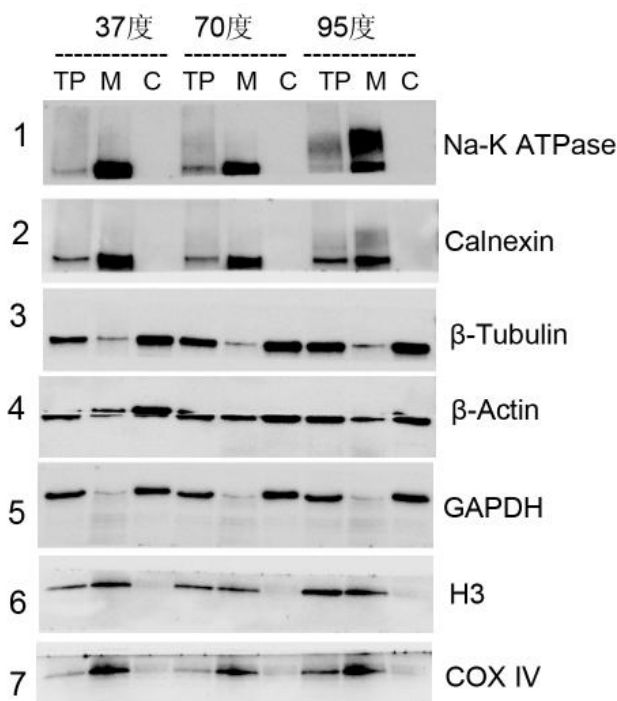
标蛋白抗体检测膜蛋白，验证是否可以检测到目的蛋白，蛋白大小是否符合预期。

位置	内参名称	大小 kD
细胞膜	Na-K ATPase	100
内质网膜	Calnexin	~90
线粒体膜	COX IV	17

许多研究人员利用 WB 对分离的膜蛋白进行纯度检测，经常发现一些常用的胞浆内参能在膜蛋白中检测到，例如 β -actin^[1]，GAPDH^[2] 和 β -tubulin^[3]，这是由于这些胞浆内参不仅存在于胞浆也存在于质膜中，因此可以在膜蛋白中检测到胞浆内参。更多信息，请参阅以下论文：

1. Gruenstein E., *et al.* (1975). Actin associated with membranes from 3T3 mouse fibroblast and Hela cells. *Journal of cell Biology*. 64:223-234.
2. Terrasse R., *et al.* (2012). Human and pneumococcal cell surface glyceraldehydes -3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) proteins are both ligands of human C1q protein. *J. Biol. Chem.* 287:42620-42633.
3. Wolff J. (2009). Plasma membrane tubulin. *BBA-Biomembranes* 1788:1415-1433.

四 实验示例：



样品：K562 细胞，膜蛋白提取试剂盒提取膜蛋白（M）和胞浆蛋白（C），RIPA 提取总蛋白（TP）
 温度处理：样品与 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液（货号：PL080）混合，37 度处理 30min，70 度处理 10min，95 度处理 5min

电泳: 4-18% RealPAGE 预制胶(货号: RTD6119-0420), 蛋白上样量均为 5 μ g, 恒压 200V 55min
转膜: 0.45 μ m PVDF 膜, 1 \times RealBlot 转膜缓冲液(货号: RT5020)湿转, 恒流 400 mA 35min。
封闭: 快速封闭液(货号: WR5020) RT 10 min
剥离: Western 一抗二抗去除液(弱碱, 温和型)(货号: WS1200), 37 度摇床 15 min
一抗: 1 Na-K ATPase 1:5000; 2 Calnexin 1:500; 3 β -Tubulin 1:5000 ; 4 β -Actin 1:10000; 5 GAPDH 1:10000; 6 H3 1:10000; 7 COXIV 1:5000; 常温摇床孵育 60min
二抗: 羊抗兔 IgG-HRP 1:5000 (货号: HGR1020), 羊抗鼠 IgG-HRP 1:5000 (货号: HGM1060), 常温摇床孵育 60min
检测: ECL 发光检测(货号: EC2520)