



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

http:// [www.real-times.com.cn](http://www.real-times.com.cn)

E-mail: [real-times@vip.163.com](mailto:real-times@vip.163.com)

## 细胞膜蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒

Ver 20260118-3.0

货号	名称	规格
RTD8112	细胞膜蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒	50 次

### ● 产品简介

细胞膜蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒提供了一种比较简单、方便地从培养细胞或组织中抽提细胞膜蛋白和细胞浆蛋白的方法。抽提的膜蛋白不仅包括质膜上的膜蛋白，也包括线粒体膜、内质网膜和高尔基体膜（不包含核膜）等上的膜蛋白。

本试剂盒通过膜蛋白抽提试剂 A 通透细胞，经低速离心沉淀去除细胞核和少数未破碎的细胞，随后取上清高速离心获得细胞膜沉淀和含有细胞浆蛋白的上清，然后通过优化的膜蛋白抽提试剂 B（含去垢剂）从沉淀中抽提获取膜蛋白。

约 90 分钟即可完成培养细胞或组织的细胞膜蛋白与细胞浆蛋白的分离和抽提。抽提得到的蛋白可以用于 SDS-PAGE，Western、酶活性测定等后续实验。

由于提取的膜蛋白样品中含有去垢剂，不建议用于非变性电泳（BN 电泳，Tris-甘氨酸非变性电泳，Bis-Tris 非变性电泳）。

本试剂盒按照本说明书的操作步骤，如果每次使用细胞的数量为  $2-5 \times 10^7$  或组织重量为 100 mg，本试剂盒可以提取 50 个样品。

### ● 产品组成

产品编号	名称	规格
RTD8112-01	膜蛋白抽提试剂 A	50 ml
RTD8112-02	膜蛋白抽提试剂 B	10 ml
YMC07-05	塑料研磨杵	5 根/包
	说明书	-

### ● 贮存、效期和运输：

-20℃贮存；有效期一年；试剂盒湿冰运输。

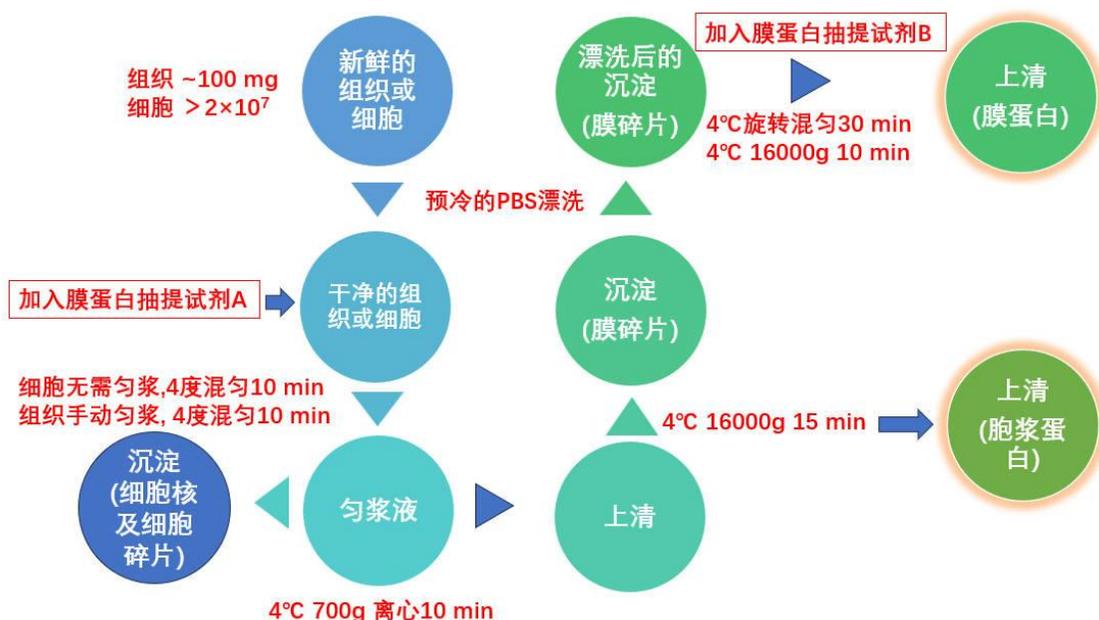
### ● 用前必读：

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℃低温离心机中进行。
2. 将膜蛋白抽提试剂 A 和 B 溶化混匀后放置于冰上预冷。
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抽提试剂中（如抑制剂母液是 100×，添加时按照 1:100 添加，即 1ml 膜蛋白抽提试剂添加 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. 由于抽提试剂含有去垢剂，蛋白定量推荐使用 BCA 方法。

### ● 实验流程图：



### ● 使用方法：

#### 自备材料：

1×PBS；台盼蓝染色液；蛋白酶抑制剂或磷酸酶抑制剂；剪刀或刀片；冰；1.5 ml 离心管。

#### 1. 准备溶液：

混匀膜蛋白抽提试剂，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。

#### 2. 准备细胞或组织样品：

##### 2.1 细胞样品：

##### 2.1.1 对于贴壁细胞：

培养约 2000-5000 万 ( $2-5 \times 10^7$ ) 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。

##### 2.1.2 对于悬浮细胞：

培养约 2000-5000 万 ( $2-5 \times 10^7$ ) 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。

### 2.1.2 细胞预处理（关键步骤）：

把 1 ml 膜蛋白抽提试剂 A 加入细胞沉淀中，轻轻并充分悬浮细胞，4 度旋转混匀 10 分钟或冰浴 10 分钟（间歇颠倒轻柔混匀 3 次）；**不要剧烈涡旋震荡。**

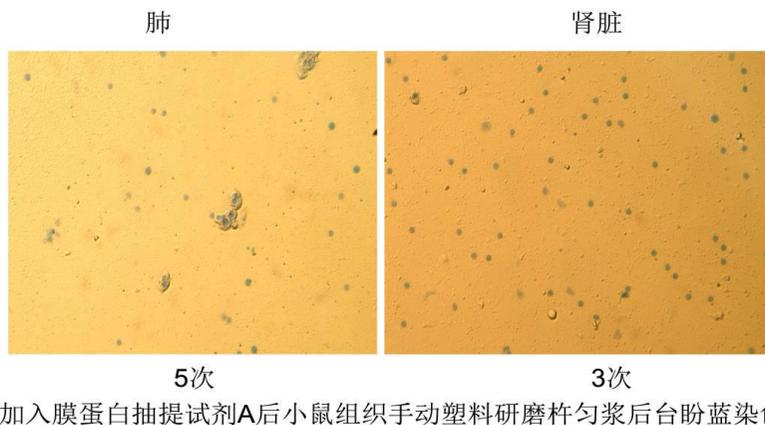
注：此步骤是通透细胞膜，可以用台盼蓝染色快速判断通透是否合适，取 10  $\mu$ l 裂解溶液加等体积台盼蓝染色液，染色后大多数细胞应台盼蓝阳性（蓝染主要局限在细胞轮廓内；细胞轮廓完整，细胞仍是规则圆形/椭圆形；看不到大量碎片或弥散染料）；避免通透过度：一旦出现大量细小颗粒，看不到细胞轮廓，出现“蓝点雾化/碎片云”就是通透过度，此时会导致膜浆交叉污染。

### 2.2 组织样品：

2.2.1 组织漂洗：取约 100 mg 新鲜组织，用 1 $\times$ PBS 清洗两次，弃净清洗液。

**2.2.2 组织破碎（关键步骤）：**用剪刀或刀片尽量小心剪切成细小的组织碎片，置于 1.5 ml 离心管中，先加入 0.5 ml 膜蛋白抽提试剂 A，轻轻悬浮组织碎片；用塑料研磨杵在 1.5 ml 离心管中**旋转研磨组织 2-5 次，至组织成为匀浆悬浮液**，再补加入 0.5 ml 膜蛋白抽提试剂 A，继续旋转研磨 2-3 次，每 100 mg 组织需要使用 1 ml 抽提试剂 A。

注：此匀浆步骤为关键环节，质地较软的组织如肺，肝脏，肾脏，脑组织推荐使用配套的塑料研磨杵研磨组织。质地硬的组织如肌肉组织可以使用玻璃匀浆器匀浆。如果使用玻璃匀浆器匀浆，要使用松散型间距的玻璃匀浆器，因为紧致型间距的玻璃匀浆器极易导致组织匀浆过度。匀浆次数原则是宁少勿多，**建议初始匀浆次数 2-3 次**，过度匀浆会导致膜浆交叉污染。破碎效果与组织细胞类型有关，不同的样品所需匀浆次数不同。鉴定方法：取 10  $\mu$ l 匀浆后的样品，加入等体积的台盼蓝溶液，混匀，在显微镜下观察台盼蓝溶液染色阳性（蓝色）细胞数目的比例，当阳性（蓝色）细胞破碎达到 80%即可停止匀浆，请勿过度匀浆。若阳性（蓝色）细胞比例未达到 80%，适当增加 1-2 次匀浆，随后按照同样的方法使用台盼蓝溶液进行鉴定。



2.2.3 匀浆后的悬液 4 度旋转混匀 10 分钟或冰浴 10 分钟（间歇颠倒轻柔混匀 3 次）；**不要剧烈涡旋震荡。**

### 3. 去除细胞核:

将细胞处理液或组织匀浆液 700 g (~2700 rpm) 4°C离心 10 分钟, 小心将上清转移到新的 1.5 ml 离心管中。注: 转速不要超过 700 g, 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, 可以只吸取 80%体积上清, 以免上清中污染核蛋白。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。

### 4. 沉淀膜蛋白:

上清溶液 16000 g (~13000 rpm) 4°C离心 15 分钟, 沉淀即为提取的膜蛋白。

### 5. 收集胞浆蛋白:

5.1 小心吸取上清置于 1.5 ml 离心管中, 吸取上清时可以有 30-50 微升上清残留, 以避免接触沉淀导致胞浆蛋白中污染膜蛋白。

5.2 为提高胞浆蛋白纯度, 上清溶液 16000 g (~13000 rpm) 4°C再次离心 15 分钟, 收集上清即为最终的胞浆蛋白, 可-70°C保存备用。

注: 每 5000 万细胞使用本产品裂解可获得 5-30 mg 细胞浆蛋白, 不同细胞有所不同。

### 6. 抽提膜蛋白:

#### 6.1 膜蛋白漂洗:

去除步骤 4 膜蛋白沉淀中残余的上清, 加入预冷的 1 ml 1×PBS 悬浮沉淀, 4°C, 16000 g (~13000 rpm) 离心 5 min, 去除上清; 重复漂洗一次。

注: 此步骤能去除粘连在膜蛋白表面的胞浆蛋白, 提高膜蛋白的纯度。

#### 6.2 膜蛋白溶解:

尽最大努力吸尽上清(可以轻轻触碰到沉淀, 甚至吸走很少量的沉淀)。加入 100 微升膜蛋白抽提试剂 B, 移液器轻轻吹打多次以获得均质的悬液, 置于旋转混匀仪上, 4°C 孵育 30 min 或者涡旋剧烈震荡, 冰浴处理 30 min, 间歇剧烈震荡 3-5 次。

#### 6.3 膜蛋白收集:

4°C, 16000 g (~13000 rpm) 离心 15 分钟, 收集上清即为细胞膜蛋白溶液。可-70°C保存备用。

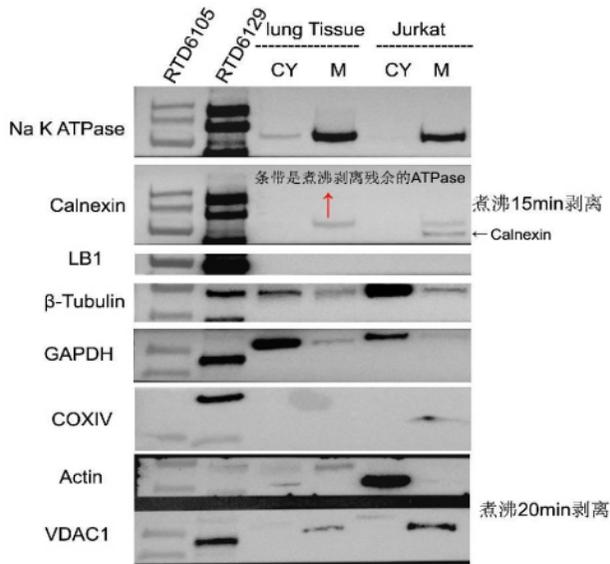
注: 每 5000 万细胞使用本产品裂解可获得 0.3-3 mg 细胞膜蛋白, 不同细胞有所不同。

### 7. 膜蛋白样品处理(变性):

测定提取膜蛋白浓度, 根据浓度混合细胞膜蛋白样品和 SDS-PAGE 上样缓冲液, 根据膜蛋白性质进行变性处理, 直接上样到 SDS-PAGE 胶加样孔内即可。

注: 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 50 度处理 10 分钟, 不要 95°C 或煮沸加热处理, 因为在高温情况下, 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, 如一些 ATPase、ABC、SLC、GLUT 家族蛋白。

### 8. 实验示例:



#### 小鼠肺组织，Jurkat 膜浆分离

提取过程简述：100 mg 冷冻肺组织，PBS 漂洗两次，1 ml 抽提试剂 A，玻璃匀浆器匀浆 10 次（过度匀浆）； $1 \times 10^7$  Jurkat 细胞，PBS 漂洗一次，1 ml 抽提试剂 A，不匀浆；4 度旋转混匀 10 min；700 g 去核；上清 16000 g 30min，上清为 CY，各约 0.8 ml，肺组织 CY 浓度 6  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，Jurkat CY 浓度 0.7  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ；沉淀 PBS 漂洗一次，肺组织沉淀中加 200  $\mu\text{l}$  抽提试剂 B，Jurkat 沉淀加 100  $\mu\text{l}$  抽提试剂 B；4 度旋转混匀 45min，16000 g 15min 取上清为膜蛋白 M，肺组织膜蛋白浓度 3.7  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，Jurkat 膜蛋白浓度 0.3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

电泳：RTD6119-0420 11 孔预制胶 Lot#85129006；蛋白上样 20  $\mu\text{l}/4 \mu\text{g}$

转膜：1 $\times$ 快速转膜液加 10%乙醇，恒流 400 mA，电压变化 72-60 V 40min

Na-K ATPase 抗体：康何欣 CMA5242 重组兔单抗 1: 2000

Calnexin 抗体：华安 ET1611-86 兔单抗 1: 500（煮沸剥离后孵育）

LB1: 华安 ET1606-27 兔单抗 1: 3000

$\beta$ -Tubulin Abmart M20005S 鼠单抗 1: 2500（煮沸剥离后孵育）

GAPDH 华安 ET1601-4 兔单抗 1: 10000（煮沸剥离后孵育）

COXIV 华安 ET1701-63 兔单抗 1: 3000

1.在组织样本中过度匀浆会导致线粒体、内质网等细胞器与膜碎片和细胞骨架形成大分子复合体，从而在低速（700 g）离心条件下与细胞核共同沉淀。解释了在肺组织膜蛋白中看不到 Calnexin 和 COXIV；

2.Jurkat 抽提试剂 A 中可以实现高度选择性的质膜破裂，使胞浆蛋白主要分布于胞浆组份而膜蛋白富集于膜组份。