

产品介绍

Proteintech研发的此款膜蛋白抽提试剂盒可高效的从动物组织或培养的细胞中抽提膜蛋白，抽提得到的膜蛋白不仅包含细胞膜蛋白，还包含部分亚细胞器上的膜，如：线粒体膜、内质网膜、高尔基体膜等。抽提得到的膜蛋白可用于蛋白免疫印迹，免疫沉淀等后续实验。

关于试剂盒

● 本试剂盒中有0.4%台盼蓝溶液可用于鉴定匀浆效果，细胞破碎率达到80%即可停止匀浆，请勿过度匀浆。

● 如果每个样品的数量为2000万个细胞或100 mg组织，本试剂盒可以处理30个样品。

产品成分

组分	规格
膜蛋白抽提试剂A	30 mL
膜蛋白抽提试剂B	10 mL
SDS-PAGE蛋白上样缓冲液 (4×)	2 mL
普通型蛋白酶抑制剂混合液 (100×)	0.5 mL
0.4%台盼蓝溶液	1 mL

包装规格

30 T

保存条件

-20℃保存，一年有效。一个月内使用可4℃保存。

使用方法

1、提取前准备：将试剂盒中试剂室温解冻，后放置于冰上。提前4℃预冷离心机。膜蛋白抽提试剂A和膜蛋白抽提试剂B根据提取的样本量分别取出对应体积的试剂，在使用前按100:1添加蛋白酶抑制剂混合液 (100×) 备用。

2、样品预处理

a、对于细胞：收集细胞4℃，500 g离心5 min，用预冷的PBS洗涤两遍，尽可能吸取残留的PBS。然后在冰上，按每2000万细胞直接加入1 mL预冷的膜蛋白抽提试剂A。

b、对于组织：现取新鲜的动物组织，用冰的PBS洗净组织块上附着的脂肪和血液等杂质，用滤纸吸干水分后称重，在离心管中将组织块剪碎，然后在冰上，按每100 mg组织加1 mL预冷的膜蛋白抽提试剂A。

3、将样品悬液转移到合适大小的预冷玻璃匀浆器中，在冰浴条件下对样品匀浆30-50次。注：不同的样品所需匀浆次数不同。鉴定方法：取20 uL匀浆30次后的细胞样品或组织样品，加入等体积的0.4%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）细胞破碎率达到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5-10次匀浆，随后按照同样的方法使用台盼蓝溶液进行鉴定。

注：对于培养的细胞也可以采用涡旋震荡法和反复冻融法来破碎细胞。

涡旋震荡法：将步骤2中已经加入了膜蛋白抽提试剂A的样品，在涡旋仪上剧烈涡旋1 min（涡旋10 s，停10 s），然后冰上放置2 min，重复涡旋及放置步骤4-5次，然后取少量样品台盼蓝染色检测其细胞破碎程度，如果细胞破碎程度不足80%，可以增加剧烈涡旋次数，直到细胞破碎程度大于80%。

反复冻融法：将步骤2中已经加入了膜蛋白抽提试剂A的样品，在液氮和室温依次反复冻融两次，然后取少量样品台盼蓝染色检测其细胞破碎程度，如果细胞破碎程度不足80%，可以增加反复冻融次数，直到细胞破碎程度大于80%。

4、将匀浆好的样品4℃，700 g离心10 min，收集上清（吸取上清时不要接触沉淀）。

5、将收集的上清4℃，16000 g离心30 min，沉淀为细胞膜碎片，上清为细胞胞浆蛋白。

6、向收集的沉淀中加入100 uL膜蛋白抽提试剂B。在涡旋仪上高速剧烈涡旋，涡旋10 s停10 s共2 min，冰浴10 min，重复涡旋及冰浴步骤3次，以充分抽提膜蛋白。

7、4℃，16000 g离心10 min，收集上清即为细胞膜蛋白。

8、根据实验需要，按照3:1比例，混合细胞膜蛋白样品和SDS-PAGE上样缓冲液。100℃沸水浴加热5 min，以充分变性蛋白。冷却至室温后，直接上样到SDS-PAGE胶加样孔内即可。

注：用于多次跨膜蛋白检测的膜蛋白样品可以使用37℃水浴45 min代替100℃沸水浴加热5 min，蛋白不易形成聚集体，可以有效保留蛋白的三级结构。如一些ATPase、ABC、SLC、GLUT家族蛋白。

注意

1、提取膜蛋白的所有步骤都需在低温下进行。

2、不同的样品中膜蛋白的含量不同，可根据实验情况调整膜蛋白抽提试剂A和膜蛋白抽提试剂B的使用量。

3、本试剂盒对新鲜的组织样本具有很好的提取效果，对冻存的组织样本效果相对较差，请优先选用新鲜的样本提取。

4、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液中含少量DTT，有轻微刺激性气味，但不含剧毒的巯基乙醇。

5、用于多次跨膜蛋白检测的膜蛋白样品可以使用37℃水浴45 min代替100℃沸水浴加热5 min，蛋白不易形成聚集体，可以有效保留蛋白的三级结构。如一些ATPase、ABC、SLC、GLUT家族蛋白。

6、用于制备膜蛋白样品，膜蛋白抽提试剂A和膜蛋白抽提试剂B都需提前加入蛋白酶抑制剂混合物（货号：[PR20032](#)）。用于磷酸化抗体检测还需提前加入磷酸酶抑制剂混合物（货号：[PR20015](#)）。

7、本试剂盒中的普通型蛋白酶抑制剂混合液适用于常规蛋白的提取，针对特别容易降解的蛋白推荐使用增强型蛋白酶抑制剂混合液（货号：[PR20016](#)）。

8、抽提得到的细胞膜蛋白可以使用BCA法测定蛋白浓度（推荐使用Proteintech BCA蛋白浓度检测试剂盒（货号：[PK10026](#)）），不适用Bradford法测蛋白浓度。

9、本试剂盒中试剂都应在室温下溶解，请勿加热。

10、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴好一次性手套操作。

问题解答

问题

可能原因

解决方案

未得到膜蛋白	样品破碎过度，导致细胞膜研磨过碎	减少匀浆、涡旋、冻融次数
膜蛋白得率低	研磨不充分	增加匀浆次数
	样品量太少	增加提取的样品量
	样品不新鲜	取新鲜样品制备

分离流程

