

G 蛋白偶联受体 (GPCR) 提取和稳定试剂盒使用说明书

【包装规格】

产品编号	产品名称	包装
EK-6020	G蛋白偶联受体 (GPCR) 提取和稳定试剂盒	50T/100T
EK-6020-1	GPCR蛋白提取及稳定剂	50ml/100ml
EK-6020-2	蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物 (All-in-one,50 ×)	1ml/2ml
	使用说明书	1 份

【保存条件】

GPCR 蛋白提取及稳定剂保存于 2-8℃；蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物-20℃保存一年

【产品概述】

提取后稳定受体的天然和功能形式面临诸多挑战，这使得细胞膜外研究极其困难。本提取试剂可在 1-2 小时内高效地从哺乳动物细胞或组织中提取功能性受体。大多数功能性 GPCR 检测必须在受体提取后立即进行，因为受体活性会随着时间的推移迅速下降。

本品主要用于从培养的哺乳动物细胞或组织中提取和稳定 G 偶联蛋白受体 (GPCR) 及其他膜相关蛋白。该提取试剂将受体封装在经过专门优化的去垢剂胶束中，以确保提取后受体在 4℃ 下储存时可保持长达 1 周的功能，在 -20℃ 下储存时可保持长达 1 个月的功能。

本品每 1ml 可用于 1×10^6 个细胞或 50-100 mg 组织的 GPCR 及各类膜蛋白的提取。

【操作方法】

使用前：GPCR 提取及稳定剂根据用量提前加入蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物，每 1ml GPCR 蛋白提取及稳定试剂中加入 20ul 蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物，现配现用。

A: 对于贴壁细胞:

1. 在培养板上用 10-15 mL 预冷 PBS 清洗细胞两次。
2. 加入 1 mL 预冷 PBS，用细胞刮刀将细胞从板表面刮掉（或胰酶消化收集细胞，消化后记得及时终止消化）。
3. 将 1×10^6 个细胞重悬于 1 mL 预冷的 PBS 中。收集细胞悬液，4℃， $500 \times g$ 离心 5 分钟。
4. 小心吸出并弃去上清液。用 1 mL 预冷的 PBS 重悬细胞，并转移至 1.5 mL 离心管中。4℃ 下 $500 \times g$ 离心 5 分钟，弃去上清液。

5. 将 1 mL 预冷的 GPCR 提取及稳定剂（含抑制剂）加入细胞沉淀中。用移液器上下吹打 10-15 次充分混匀，然后短暂涡旋以获得均匀的细胞悬液。在 4°C 下持续旋转或振荡孵育 30 分钟充分裂解。

注意：对于过度表达系统，在此步骤需要进行轻度机械破坏以获得最佳效果（如对于 Expi293 系统，使用 Dounce 均质机或手持式组织研磨机进行均质化可增加活性受体的产量）。

6. 将管子在 4°C 下以 16,000×g 的速度离心 20 分钟。小心地吸取含有稳定蛋白受体的上清液，并将其转移到新的离心管中。

7. 立即进行下游应用或将提取物等分试样储存在 4°C 下保存长达 1 周或在 -20°C 下保存长达 1 个月以备将来使用，同时最大程度地减少受体功能的损失。

注意：对于悬浮细胞 GPCR 提取，以 500×g 离心 5 分钟收获 1×10^6 个细胞。用 10-15 mL 冷 PBS 清洗收获的细胞沉淀物两次，并在 4°C 下以 500×g 离心 5 分钟。小心吸出并弃去上清液。用 1 mL 预冷的 PBS 重悬细胞，并转移至 1.5 mL 离心管中。4°C, 500 × g 离心 5 分钟，弃去上清液。后进行步骤 5 及后续步骤。

B: 对于组织样本:

1. 将 50-100 mg 组织置于 5 mL 离心管中。加入 4 mL 预冷 PBS，短暂涡旋，弃去洗液。

2. 转移至 2 mL Dounce 匀浆器中，用剪刀将组织剪成小块。加入 1 mL 预冷 GPCR 提取和稳定剂（含抑制剂），匀浆至均匀悬浮（10-15 次）。

注意：使用手动组织研磨机进行均质化是可以的，但留意可能会导致起泡，勿使用超声破碎。

3. 将匀浆转移到新管中，在 4°C 下持续旋转或振荡孵育 30 分钟充分裂解。

4. 将管子在 4°C 下以 16,000×g 的速度离心 20 分钟。小心地吸取含有稳定蛋白受体的上清液，并将其转移到新的离心管中。

5. 立即进行下游应用或将提取物等分试样储存在 4°C 下保存长达 1 周或在 -20°C 下保存长达 1 个月以备将来使用，同时最大程度地减少受体功能的损失。

【注意事项】

1. 高温可能破坏膜蛋白及 GPCR 结构，尤其是结合脂类的受体可能发生聚集或失活，导致信号弱或 smear。煮样时需采用温和条件：加完上样缓冲液后 50°C 30 分钟处理，不要加热至 90-100°C。

2. 多数膜蛋白试剂不能很好用于 GPCR 的提取，本产品可同时用于 GPCR 和各类膜蛋白的提取。如加上样缓冲液膜蛋白无法溶解后出现沉淀，可适当超声再加样（若无则不需要）。

3. 该产品仅实验室使用，不适合农业/家庭/临床用途使用。