

ProEx 高纯动物细胞/组织细胞质和细胞膜蛋白提取试剂盒使用说明书

【包装规格】

产品编号	产品名称	包装
EK-6010	ProEx High-Purity Membrane and Cytosol Protein Extraction Kit	20T/50T/100T
EK-6010-1	高纯细胞质蛋白提取试剂 A	40mL/100mL/200mL
EK-6010-2	高纯细胞膜蛋白提取试剂 B	20mL/50mL/100mL
EK-6010-3	20×Wash Buffer	5mL/15mL/30mL
	使用说明书	1 份

【保存条件】

4°C保存，有效期 6 个月；-20°C保存，有效期 12 个月

【概述】

本试剂盒采用温和的非变性分步抽提技术，通过细胞溶胀和差速离心，从哺乳动物样本中分离天然结构的细胞膜蛋白和细胞浆蛋白。

分离范围：质膜及各种细胞器膜（线粒体、内质网、高尔基体等）。

优势：保持膜蛋白天然空间结构与活性，实现 3-5 倍富集。

应用：酶活检测、激酶分析、Native-PAGE、Western Blot（WB）及蛋白质组学研究。

适用样本：贴壁培养细胞、悬浮生长组织培养细胞、冷冻细胞沉淀、组织。

【使用前准备】

- 1. 预冷：**确保所有缓冲液充分解冻并混匀。试剂 A、试剂 B 和 Wash Buffer 在操作过程中必须始终保持在冰上。整个操作过程（离心、匀浆、孵育）必须在 4°C 或冰上进行。
- 2. 完全裂解液配制（临用前）：**根据实验用量，向试剂 A 和试剂 B 中加入蛋白酶抑制剂（如 ES-8315）或蛋白酶/磷酸酶抑制剂（如 ES-8317）。
- 3. 1×Wash Buffer 工作液配制：**取 1mL 加入 20×Wash Buffer 19mL 去离子水混匀稀释，配制成 1×工作液，冰上备用。

【操作步骤】

I. 培养细胞提取（超始量：5×10⁶-1×10⁷ 个细胞）

1. 细胞收集：

贴壁细胞：弃培养基，1×Wash Buffer 洗涤一次。加入适量 Wash Buffer，推荐用细胞刮刀刮下细胞（或用 EDTA 溶液(0.03%)处理细胞使细胞不再贴壁很紧，并用移液器吹打下细胞）。500×g 离心 5min 收集细胞，彻底吸尽上清。*注：严禁胰酶消化。*

悬浮细胞：500×g 离心 5 min 收集细胞，弃上清。用预冷 1×Wash Buffer 洗涤一次，再次离心并彻底吸干上清，留细胞沉淀备用。

2. **细胞质蛋白提取**: 加入 2mL 冰冷试剂 A (含抑制剂), 轻轻吹打重悬, 4°C 摇晃孵育 10min。
3. **收集细胞质蛋白**: 4°C, 16,000×g 离心 15min。上清液即为**细胞质蛋白**, 转移至新管或-80°C 保存。
4. **提取膜蛋白**: 向沉淀中加入 1 mL 冰冷试剂 B (含抑制剂), 彻底吹打均匀, 4°C 轻柔振荡孵育 30min。
5. **膜蛋白收集**: 4°C, 16,000×g 离心 15min。收集上清液转移至新管, 即为**细胞膜蛋白**。

II. 组织样本提取 (起始量: 50-80mg 新鲜或速冻组织)

1. **组织预处理**: 切除结缔组织和脂肪等非目标组织, 剪成约 2mm³ 碎块。加入 2mL 1×Wash Buffer, 轻轻颠倒混匀。

2. **洗涤**: 4°C, 100×g 离心 2min, 弃上清。重复此步骤 1-2 次, 直至洗液澄清, 吸净洗液。

注意: 此处可速冻组织沉淀保存至-70°C 以下。

3. **匀浆破碎**: 加入 2mL 冰冷试剂 A (含抑制剂), 转移至预冷的匀浆器 (最优是玻璃匀浆器或其它匀浆器设备)。

4. **质控鉴定**: 冰浴匀浆约 30-50 次。可取 2 μL 匀浆液显微镜观察: 当 70-80% 的细胞呈现无核周晕环且形态不完整时, 停止匀浆。若仍有大量完整细胞, 需补加 10-30 次匀浆。

匀浆效果与细胞类型和组织类型相关, 不同细胞或组织所需的匀浆次数有所不同, 需自行优化。通常可以在匀浆 30 次后取约 2-3 微升细胞或组织匀浆液滴在盖玻片上并在显微镜下观察, 如见细胞核周晕环或完整的细胞形态, 说明细胞仍完整。如果有 70-80% 的细胞均无核周晕环和完整细胞形态, 说明细胞已经充分破碎, 则进行下一步实验。否则, 重新匀浆 10-30 次直到细胞至少 70% 已经破碎。

5. **提取细胞质蛋白**: 将匀浆液转至离心管, 4°C 轻柔摇晃孵育 10min。

6. **收集细胞质蛋白**: 4°C, 16,000×g 离心 15min。上清液即为**细胞质蛋白**, 转移至新管或-80°C 保存。

7. **提取膜蛋白**: 向沉淀中加入 1 mL 冰冷试剂 B (含抑制剂), 彻底吹打均匀, 4°C 轻柔振荡孵育 30min。

8. **膜蛋白收集**: 4°C, 16,000×g 离心 15min。收集上清液转移至新管, 即为**细胞膜蛋白**。

【注意事项】

1. **严禁高温煮样**: 膜蛋白含有大量疏水区, 高温会导致其发生不可逆的聚集。WB 实验前, 建议加完上样缓冲液后采用温和变性: 37°C 孵育 30-60min 或 50°C 孵育 30min。

2. **低温保护**: 膜蛋白对热敏感, 所有离心、匀浆及孵育步骤必须在 4°C 或冰上进行, 否则会导致蛋白弥散。

3. **膜蛋白保存**: 提取后的膜蛋白建议小量分装。短期 (3-5 天) 使用建议置于 4°C 保存; 如需-80°C 长期保存, 请务必分装并避免反复冻融, 推荐加入 5% 左右的甘油以增强稳定性。

4. **特殊蛋白说明**: 对于极难抽提的多重跨膜蛋白 (如 GPCR 受体), 如本试剂盒效果未达预期, 建议选用 EK-6020 ProEx G 蛋白偶联受体 (GPCR) 提取和稳定试剂盒。

5. **浓度测定**: 推荐使用 EK-5001 BCA 蛋白定量试剂盒。建议先将样本稀释 5-10 倍后再测定, 以排除背景干扰。

6. **安全防护**: 本试剂盒仅供科研使用。操作时请佩戴实验服及手套。