

ProEx 天然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-6030	ProEx Native Membrane Protein Extraction Kit	20T/50T/100T
EK-6030-1	Extraction Buffer I	40ml/100ml/200ml
EK-6030-2	Extraction Buffer II	20ml/50ml/100ml
EK-6030-3	20×Wash Buffer	5ml/15ml/30ml
	使用说明书	1 份

【保存条件】

-4℃保存，有效期 6 个月；-20℃保存，有效期 12 个月

【概述】

ProEx 天然膜蛋白提取试剂盒专为从各种哺乳动物样本中高效分离具有天然活性结构的膜蛋白而设计。

核心原理：利用非变性表面活性剂分步抽提，将胞质蛋白与膜蛋白有效分离。

主要特征：实现整体膜和膜相关蛋白 3-5 倍的丰度富集。

应用场景：特别适用于需要保持蛋白空间构象的功能研究，如酶活性检测、激酶分析、Native-PAGE、ELISA、免疫共沉淀（Co-IP）及膜蛋白组学分析。

【使用前准备】

- 1. 配制 1×Wash Buffer 工作液：**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。
- 2. 完全提取液配置：**临用前，根据实验用量向 Buffer I 和 II 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）必须现配现用，严禁长期存放已加抑制剂的缓冲液。
- 3. 低温控制：**确保所有步骤均在 4℃ 进行。

【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. 细胞裂解：**加入 2mL Buffer I（含抑制剂），轻轻吹打重悬，4℃ 摇晃孵育 10min。

3. **离心:** 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 Buffer II (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 Buffer I (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. **裂解:** 将匀浆液转至离心管, 4°C 轻柔摇晃孵育 10min。
6. **离心:** 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 Buffer II (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。