

ExKine™ 总膜蛋白提取试剂盒

Cat #: KTP3004

Size: 50 T/200 T

	总膜蛋白提取试剂盒		
	货号 : KTP3004		批号: 见产品标签
	适用样本 : 动物组织、细胞		
	保质期 : -20°C保存 12 个月		

原理

膜蛋白在细胞中扮演着重要的角色：例如被熟知的识别、信号转导、运输等功能，也是用药的理想的靶点。所得的膜蛋白可以应用于 WB, Dot blot, IP 等下游实验。ExKine™ 总膜蛋白提取试剂盒提供简单、快速和可复制的方法，从新鲜的哺乳动物组织和培养细胞中提取总膜蛋白，提取的蛋白纯度高且保持天然活性，绝少交叉污染。该方法基于温度依赖性分离。样品首先在膜蛋白提取缓冲液中混合并匀浆。膜蛋白提取缓冲液在低温（4°C）的时候溶解度高，根据有机物相似相溶的原理，这时膜蛋白就会和提取缓冲液相溶（膜蛋白是嵌在膜中的，水溶性不好）；在 37°C 反而溶解度低，从而将大部分提取缓冲液连同膜蛋白一起析出分在下层有机相。

包装清单

试剂盒组分	规格		储存条件
	50 T	200 T	
Extraction Buffer (2×)	25 mL	100 mL	4°C
Wash Buffer (2×)	15 mL	60 mL	4°C
Protease Inhibitor (100×)	0.8 mL	3.2 mL	-20°C

自备耗材

- 涡旋仪、离心管
- 细胞刮刀
- 可调节式移液枪及枪头
- 磷酸盐缓冲液(PBS)、去离子水
- 匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

Working Extraction Buffer (1×) : 使用前，用去离子水稀释成 1×Extraction Buffer，立即加入 10 μL Protease Inhibitor (100×)到 1 mL 1×Extraction Buffer 中，置于冰上；4°C 保存。

Working Wash Buffer (1×) : 使用前，用去离子水稀释成 1×Wash Buffer，立即加入 10 μL Protease Inhibitor (100×)到 1 mL 1× Wash Buffer 中，置于冰上；4℃保存。

Protease Inhibitor (100×) : 即用型；使用前，置于冰上；-20℃保存。用不完的试剂-20℃分装保存，避免反复冻融。

实验步骤

注意：所有的实验步骤需在 2-8℃进行。使用预冷的缓冲液和设备。确保所有的溶液是解冻和均匀的。

I 细胞培养物的制备

1. 对于贴壁细胞，用细胞刮刀收获 $1-3 \times 10^7$ 个细胞，然后 500 g 离心 5 min。对于悬浮细胞，500 g 离心 5 min。
2. 用预冷的 PBS 重悬细胞沉淀，500 g 离心 2-3 min，弃上清。
3. 向细胞沉淀中加入 1 mL 预冷的 1×Working Extracion Buffer 后，用匀浆器匀浆细胞 30-50 次，继续步骤 III。

II 组织制备

1. 将 50-100 mg 组织切成小块，放入离心管中。
2. 用预冷的 PBS 清洗组织，500 g 离心 5 min，弃上清。
3. 用 1 mL 预冷的 1×Working Extracion Buffer 轻柔重悬组织。
4. 使用匀浆器或组织研磨机匀浆组织，直至超过 90% 的细胞被破坏，细胞核在显微镜下可见，继续步骤 III。

III 膜疏水和亲水蛋白的分离

1. 将裂解物放置于冰上 10 min。

注意：如果有需要，可以保存 50-100 μL 总蛋白质裂解物，做进一步分析。

2. 10,000 g，4℃离心 5 min。
3. 将上清液转移到新的离心管中并弃掉沉淀，上清在 37℃孵育 5 min，直至变浑浊，在孵育期间，上下颠倒离心管。
4. 3,000 g，室温离心 3 min。

注意：确保离心机的温度高于 20℃，不要将离心后的管放到冰上。离心后注意观察液体分层，离心后的溶液必须有明显分层，否则重复该步骤。上层液体为亲水相（胞浆蛋白），下层呈粘稠油状为疏水相，含疏水蛋白（膜蛋白）。

5. 下层疏水相极大的富集了疏水蛋白，将上层包含亲水蛋白的亲水相转移到新的离心管做进一步分析。
6. 为了从疏水相中去除残留的亲水蛋白，加入 400 μL 1×Working Wash Buffer 到疏水相，轻柔混匀，冰上孵育 10 min，重复步骤 3-5。
7. 如果无需立即进行下游实验，分装膜蛋白，并迅速冷冻后，储存于-80℃。
8. 对于 SDS-PAGE 直接使用分离的膜蛋白煮沸后进行电泳。对于 IP 实验 在加入抗体前，可用 10-15 倍的 1×Working Wash Buffer 先稀释疏水蛋白。

注意：如果需要，可以通过 TCA 沉淀样品以获得更浓缩的样品。

相关产品

Catalog No.	Product Name
KTP3001	ExKine™ 核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒
KTP3002	ExKine™ 核蛋白提取试剂盒
KTP3003	ExKine™ 胞浆蛋白提取试剂盒
KTP3005	ExKine™ 膜蛋白与胞浆蛋白提取试剂盒
KTP3006	ExKine™ 总蛋白提取试剂盒

免责声明

本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。