

## 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 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℃ 保存，有效期 6 个月；-20℃ 保存，有效期 1 年。

### 【概述】

本品提供了一种比较简单、方便地从 培养细胞或组织中抽提细胞膜蛋白和细胞浆蛋白的方法。抽提的膜蛋白不仅包括质膜上的膜蛋白，也包括线粒体膜、内质网膜和高尔基体膜等上的膜蛋白。本品从各种哺乳动物样本中分离天然结构膜蛋白而设计，使用非变性条件为整体膜和膜相关蛋白提供 3-5 倍的富集。

本品提供的温和、非变性条件使膜蛋白处于非变性、功能状态，使其特别适合各种特殊的蛋白质组学应用和检测，如酶活性检测，包括激酶检测、非变性凝胶电泳、Western Blot 检测、ELISA 检测和整体和膜相关蛋白质的 SELDI 分析。适用样本包括：粘附组织培养细胞、悬浮生长组织培养细胞、冷冻细胞沉淀、组织。

### 【使用建议】

**使用前：**确保所有缓冲液充分解冻并用涡旋混匀。在提取过程中，Wash Buffer、高纯细胞质蛋白提取试剂 A 和高纯细胞膜蛋白提取试剂 B 保持在冰上，蛋白酶抑制剂混合液室温解冻。细胞质蛋白提取试剂 A 和细胞膜蛋白提取试剂 B 使用前加入相应体积蛋白酶抑制剂，现配现用。

20×Wash Buffer 稀释至 1×工作液备用：如取 1ml 加入 19ml 水混匀稀释，稀释后冰上备用。

#### I. 从细胞中提取细胞质与细胞膜蛋白

该方案适用于 5–10×10<sup>6</sup> 悬浮培养细胞（相当于 50–80 mg 湿重）。

**A: 对于贴壁细胞：**用预冷的 PBS 洗一遍，用细胞刮子刮下细胞，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。取 2ml 离心管收集细胞，尽最大努力吸尽上清，留下细胞沉淀备用。（注：尽量避免用胰酶消化细胞，以免胰酶降解需抽提的目的蛋白。）

**B: 对于悬浮细胞：**先离心收集细胞，再用预冷的 PBS 清洗一遍，离心收集细胞，尽最大努力吸尽上清，留下细胞沉淀备用。

1. 在离心管中加入 2ml 冰冷高纯细胞质蛋白提取试剂 A（使用前加入蛋白酶抑制剂），轻轻吹打以彻底重悬细胞，4℃ 摇晃孵育 10 分钟。

2. 以 16,000×g、4℃ 离心 15 分钟。

3. 用移液器转移上清（细胞质蛋白）转移至新的离心管中或冻-80℃备用，注意不要扰动沉淀。
4. 往沉淀中加入 1 ml 冰冷高纯细胞膜蛋白提取试剂 B（使用前加入蛋白酶抑制剂），彻底重悬吹打均匀，4℃ 轻柔振荡孵育 30 分钟。
5. 再次以 16,000×g、4℃ 离心 15 分钟。
6. 转移上清（细胞膜蛋白）至新的离心管中或冻-80℃备用，注意不要扰动沉淀。

## II. 从组织中提取细胞质与细胞膜蛋白

该方法适用于 50–80mg 新鲜或速冻组织。

组织预处理：解剖后迅速去除非目标组织（如结缔组织、脂肪、血管），将组织切成约 2mm<sup>3</sup>，使用 1×Wash Buffer 或 1×PBS 清洗后可立即速冻（步骤 1–4），若已冻存好组织取出后操作从步骤 5 开始。

1. 切除非目标组织，组织切片后置入含 2 ml 冰冷 1×Wash Buffer 的管中。
2. 轻轻颠倒混匀，去除血细胞和松散杂质。
3. 100×g、4℃ 离心 2 分钟，弃上清。
4. 重复洗涤步骤 3–4，最终完全去除 1×Wash Buffer。

**注意：此处可速冻组织沉淀保存至-70℃以下。**

5. 将组织（或已冻存组织）置入预冷匀浆器，加入 2 ml 冰冷高纯细胞质蛋白提取试剂 A（使用前加入蛋白酶抑制剂）。
6. 低温匀浆（不同设备和样本匀浆次数有偏差），直至不见组织块。避免过度碎裂至细胞完全碎裂。

*细胞或组织样品的破碎及破碎效果的鉴定：把细胞悬液或组织样品转移到一适当大小的冰浴预冷玻璃匀浆器中，匀浆约 30-50 次，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。同时记录对于该细胞的匀浆次数，通常在后续实验时不必再摸索匀浆次数。另外需注意特定的匀浆次数和匀浆器也有关，需同时注意记录使用的是哪一个匀浆器。*

7. 将匀浆转移至预冷离心管，4℃ 轻柔摇晃孵育 10 分钟。
8. 以 16,000×g、4℃ 离心 15 分钟。
9. 用移液器转移上清（细胞质蛋白）转移至新的离心管中或冻-80℃备用，注意不要扰动沉淀。
10. 加入 1 ml 冰冷高纯细胞膜蛋白提取试剂 B（使用前加入蛋白酶抑制剂），彻底重悬组织沉淀，孵育 30 分钟。
11. 再次以 16,000×g、4℃ 离心 15 分钟。
12. 转移上清（细胞膜蛋白）至新的离心管中或冻-80℃备用，注意不要扰动沉淀。

### 【注意事项】

1. 为了您的安全与健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
2. 若膜蛋白有多次跨膜情况如 GPCR 可选择 EK-6020 ProEx G 蛋白偶联受体（GPCR）提取和稳定试剂盒。
3. 为保证最佳的使用效果，请尽量避免过多的反复冻融，可分装后使用。
4. 裂解样品的所有步骤都需在冰上或 4℃ 进行。
5. 该试剂仅用于科研领域，不宜用于临床诊断或其他用途。