

#A10038



膜蛋白提取试剂盒套装 (含内参)

Order 021-34695924
orders@ab-mart.com
Support 400-6123-828
support1@ab-mart.com
Web www.abmart.cn

产品描述

该产品为一款总膜蛋白提取试剂盒，快速且可重复的方法，基于温度依赖的相分离，制备高度富集膜蛋白和疏水蛋白。

同时试剂盒中含有配套的膜蛋白内参抗体（T55159，Sodium Potassium ATPase Antibody）。

产品组分及储存条件

货号	组分	规格	储存条件
A10008XS	膜蛋白提取试剂盒	10T	4°C
T55159XF	膜内参抗体	10ul	-20°C

膜蛋白提取流程：

1. 细胞准备

常规动物培养细胞在本流程下膜蛋白得率约为：2-4 mg/1x10⁸ 细胞，建议操作细胞量>1x10⁷ 细胞。细胞可在贴壁培养或悬浮培养下至活性浓度，一般为接近但未达饱和密度，例如 80% 满的贴壁密度，悬浮细胞约在 1-2x10⁶/ml。过高的培养密度会导致死细胞增多，在蛋白提取过程中引入更多的碎片污染，例如 DNA 纤维沉淀。悬浮培养细胞在提取前离心去上清，1xPBS 洗 2 遍去除培养基后重悬于 1xPBS 并计数备用，计数时需要使用肽酚蓝检测活细胞比例>90%。贴壁细胞使用胰酶或其它解离方法解离为单细胞悬液，一般推荐 1xPBS 含 1mM EDTA 37° C 处理 10 min 以上（不同细胞处理时间有差异）以减小对膜蛋白组的影响，细胞悬液以与悬浮培养细胞的方式洗涤与重悬计数备用。

2. 溶液准备

2.1 自备溶液：1x PBS，500mM EDTA（与 1xPBS 1:500 稀释制备细胞解离液用）

2.2 胞浆蛋白释放缓冲液 A 【适用大多数培养细胞，部分细胞系对缓冲液 A 较为敏感，在缓冲液 A 处理下会释放较多的 DNA 污染，表现为在缓冲液 A 处理下，溶液中会出现较多絮状 DNA 沉淀，导致包裹为细胞团，影响提取效率与产生污染，出现这种情况时使用胞浆蛋白释放缓冲液 B】；

2.3 胞浆蛋白释放缓冲液 B（A 液备选）；

2.4 缓冲液 C；

2.5 蛋白酶抑制剂（货号：A10004，200×，需额外购买，或者使用其他蛋白酶抑制剂）

3. 膜蛋白提取流程

3.1 预先在需要使用到的缓冲液 A/B 和缓冲液 C 中加入蛋白酶抑制剂混匀，各缓冲液 4° C 保存。

3.2 1x PBS 重悬并计数好的细胞 1000 g 离心 5 min，弃上清。

3.3 立即按 2ml/ 1x10⁷ 细胞比例加入胞浆蛋白释放缓冲液 A 或 B，充分混匀，在 4° C 冰浴下摇床温和混匀 10 min。细胞系首次实验可先使用缓冲液 A 液，如果在 A 液中出现显著絮状 DNA 释放，则需要更改为缓冲液 B 液。缓冲液 A 的加样比例根据细胞大小可作调整，一些血液来源细胞系细胞体积较小，与常规贴壁细胞系有明显差异，缓冲液 A 量可根据细胞体积差异与离心后的沉淀体积调整，例如人 B 细胞与 T 细胞来源细胞系，细胞体积可为常规贴壁细胞的 1/10 以下，缓冲液 A 可用到 2 ml/1x10⁸ 细胞。

3.4 14,000 rpm 4° C 离心 10 min，收集上清为胞浆蛋白提取液，沉淀按 0.2 ml/1x10⁷ 细胞比例加缓冲液 C，吹打混匀后，4° C 摇床温和混匀 30 min。

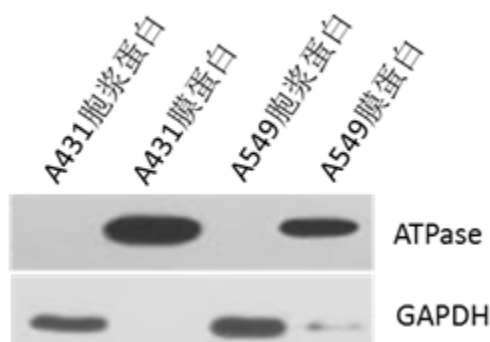
3.5 14,000 rpm 4° C 离心 10 min，收集上清即为膜蛋白提取液。

3.6 上述收集各蛋白组分进行蛋白定量，推荐氨基黑法，或稀释 5 倍以上用 Bradford 法测定。也可以使用 BCA 定量，但是准确度不高，只能用来调平上样量。

3.7 膜蛋白富集质检：各蛋白提取上清组分，制备为 SDS 蛋白裂解液，推荐蛋白浓度 1 mg/ml 以上，用于后续 WB 分析。WB 分析时，使用试剂盒所带的膜蛋白内参抗体作为内参。（同时建议带上 GAPDH 作为对照内参，判断胞浆蛋白残留情况，参考结果见下图）

动物细胞蛋白参考得率

	用量	蛋白浓度	蛋白总量	蛋白得率
Cells	1x10 ⁷			
浆蛋白 (缓冲液 A/B)	2 ml	1-2 mg/ml	2-4 mg	2-4 mg/10 ⁷ 细胞
膜蛋白 (缓冲液 C)	0.2 ml	1-2 mg/ml	0.2-0.4 mg	0.2-0.4 mg/10 ⁷ 细胞



T55159 Sodium Potassium ATPase Antibody 信息

Description: This is the catalytic component of the active enzyme, which catalyzes the hydrolysis of ATP coupled with the exchange of sodium and potassium ions across the plasma membrane. This action creates the electrochemical gradient of sodium and potassium ions, providing the energy for active transport of various nutrients.

UniProt: P05023

Mol Weight: 100kDa

Isotype: Rabbit IgG

Reactivity: Human, Mouse, Rat, Pig, Bovine, Sheep, Dog, chicken

Application: WB 1:5000~1:10000 IHC 1:50~1:100 ICC/IF 1:50~1:200 FC 1:50

产品网页: <http://www.ab-mart.com.cn/page.aspx?node=%2077%20&id=%201449>