

Mem-PER™ Plus

膜蛋白提取试剂盒

89842

2519.1

型号	产品描述
89842	Mem-PER Plus 膜蛋白提取试剂盒，其中的裂解和提取试剂足够用于 50 个左右的哺乳动物细胞样品（含有 5×10^6 个细胞/样品）或者 25 个左右的组织样品（含有 20-40 mg 组织/样品）。 试剂盒组分： 细胞清洗液， 225 mL；储存于 4℃ 增溶缓冲液， 25 mL；储存于 4℃ 透化缓冲液， 50 mL；储存于 -20℃ 储存要求：收到产品后立即将细胞清洗液和增溶缓冲液储存于 4℃。将透化缓冲液分装并储存在 -20℃，避免反复冻融。产品冰上运输。

目录

简介.....	1
重要产品信息.....	1
必需的额外材料.....	2
从不同类型样品中提取膜蛋白的流程.....	2
方案 1：贴壁的哺乳动物细胞.....	2
方案 2：悬浮的哺乳动物细胞.....	2
方案 3：软组织.....	2
方案 4：硬组织.....	3
疑难解答.....	4
相关的赛默飞世尔科技产品.....	4

简介

赛默飞世尔科技 Mem-PER™ Plus 膜蛋白提取试剂盒适用于从培养的哺乳动物细胞或组织中富集内在膜蛋白以及膜连接蛋白。该试剂盒采用温和且有选择性的基于去污剂的提取方法，从而免除了基于疏水性方法中需要进行相分离的问题，能够得到更好的重现性和更高的产量。

该产品首先用温和去污剂透化细胞释放可溶性胞浆蛋白，然后用另一种去污剂溶解膜蛋白。提取效率会随内在膜蛋白跨越脂双层的次数不同而有所变化。通常，具有至少 1-2 个跨膜结构域的蛋白具有高达 90% 的提取效率。膜组分中的胞浆蛋白的交叉污染通常小于 10%。

重要产品信息

- 为了得到最佳的效果，要在透化缓冲液和增溶液缓冲液中加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂（例如，产品号 78440）
- 使用以下蛋白定量产品可以直接量化在胞浆和/或膜组分中的蛋白含量，包括赛默飞世尔科技 BCA 蛋白定量试剂盒（产品号 23225），微量 BCA™ 蛋白定量试剂盒（产品号 23235）或 Pierce™ 660nm 蛋白定量试剂盒

(产品号 22660)

- 所得胞浆和膜两种蛋白组分都与 SDS-PAGE 直接兼容。如果因目标蛋白量低，需要较大的体积来进行有效的检测，建议使用赛默飞世尔科技 Pierce™ SDS-PAGE 样品准备试剂盒（产品号 89888）。
- 如果膜组分中的去污剂干扰下游的应用，可以用赛默飞世尔 Pierce™ 去污剂去除离心柱（产品号 87776-7）部分除去样品中去污剂。然而去除太多的试剂可能会导致蛋白沉积，所以样品:树脂的比率需要按经验确定。

必需的额外材料

- 蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂（例如产品号 78440）
- 控温搅拌器
- 细胞刮棒，用于从平板上刮下粘附的细胞
- 5 mL 微量离心管
- 对于软组织，需要一个 2 mL Dounce 组织研磨器（例如，Kontes 或 Wheaton Tenbroeck）
- 对于硬组织，需要一个用于 0.5-1.5 mL 样品的手持匀浆器（例如，Brinkmann™ Polytron™ PT-1200CL 匀浆器）

从不同类型样品中提取膜蛋白的流程

请按所用的样品类型选择恰当的方案。

方案 1: 贴壁培养的哺乳动物细胞

1. 用细胞刮棒将细胞从平板表面刮下，将 5×10^6 个细胞重悬在生长培养基中。将得到的细胞悬液以 $300 \times g$ 的速度离心 5 分钟。
2. 用 3 mL 细胞清洗液清洗细胞沉淀， $300 \times g$ 离心 5 分钟。
3. 小心移除并丢弃上清液。将细胞重悬在 1.5 mL 的细胞清洗液中并转移到 2 mL 的离心管中。 $300 \times g$ 离心 5 分钟并丢弃上清液。
4. 加入 0.75 mL 透化缓冲液到细胞沉淀中。短暂涡旋以获得均质的细胞悬液。在持续混匀条件下在 4°C 孵育 10 分钟。
5. 将透化后的细胞以 $16000 \times g$ 的速度离心 15 分钟。小心去掉含有胞质蛋白的上清液并转移到一个新的管子中。
6. 加 0.5 mL 的增溶缓冲液到沉淀中并用移液管上下抽吸进行重悬。在持续混匀条件下在 4°C 孵育 30 分钟。
7. 在 4°C 下，以 $16000 \times g$ 的速度将管子离心 15 分钟。将含有可溶性膜蛋白和膜相关蛋白的上清液转移到一个新的管子中。
8. 继续进行下游应用。在冰上的胞浆组分和膜组分可以立即使用或者分装后储存在 -80°C 条件下以备将来使用。

方案 2: 悬浮的哺乳动物细胞

1. 在 $300 \times g$ 条件下离心 5 分钟收集 5×10^6 个细胞。用 3 mL 细胞清洗液清洗细胞沉淀并在 $300 \times g$ 下离心 5 分钟。
2. 小心移除并丢弃上清液。将细胞重悬于 1.5 mL 的细胞清洗液，之后转移到一个 2 mL 的离心管中。 $300 \times g$ 离心 5 分钟并丢弃上清液。
3. 向细胞沉淀中加入 0.75 mL 透化缓冲液。短暂涡旋获得均质的细胞悬液。在持续混匀条件下在 4°C 孵育 10 分钟。
4. 将离心透化后的细胞以 $16000 \times g$ 的速度离心 15 分钟。小心地去掉含有胞质蛋白的上清液并转移到一个新的反应管中。

5. 向沉淀中加入 0.5 mL 增溶缓冲液并用吸管上下抽吸进行重悬。在持续混匀条件下在 4℃ 孵育 30 分钟。
6. 4℃ 条件下，将反应管以 16000×g 的速度离心 15 分钟。将含有可溶性膜蛋白和膜相关蛋白的上清液转移到一个新的反应管中。
7. 继续进行下游应用。在冰上的胞浆组分和膜组分可以立即使用或者分装后储存在-80℃条件下以备将来使用。

方案 3: 软组织

1. 将 20-40 mg 的软组织放置于 5 mL 的微型离心管中。加 4mL 的细胞清洗液到组织中，短暂涡旋并弃掉清洗液。
2. 转移至 2 mL 的组织研磨器中并用剪刀将组织剪切成小块。加 1 mL 的透化缓冲液到组织中并研磨直到形成均一的悬液（6-10 次）
3. 再加 1mL 的透化缓冲液并转移匀浆到一个新的反应管中，在持续混匀条件下在 4℃ 孵育 10 分钟。
可选步骤：在沉积透化的细胞之前，可采用赛默飞世尔科技 Pierce™组织过滤器产品(产品号 87791)所提供的方案除去未匀浆的组织。
4. 在 16000×g，4℃ 条件下离心 15 分钟沉积透化后的细胞。小心地去掉含有胞浆蛋白的上清液并转移到一个新的管子中。
5. 将沉积物重悬在 1 mL 的增溶缓冲液中。用移液器上下抽吸以获得均质重悬液。在持续混匀条件下在 4℃ 孵育 30 分钟。
6. 在 16,000×g，4℃ 条件下离心 15 分。将含有可溶性膜蛋白以及膜相关蛋白的上清液转移到一个新的管子中。
7. 继续进行下游应用。在冰上的胞浆组分和膜组分可以立即使用或者分装后储存在-80℃条件下以备将来使用。

方案 4: 硬组织

1. 将 20-40 mg 硬组织放置于 5 mL 的微型离心管中。向组织中加入 4 mL 细胞清洗液到，短暂涡旋并弃掉清洗液。
2. 加 1 mL 的透化缓冲液到组织中并用一把剪刀将组织剪成小块。
3. 用手持匀浆机将切碎的组织均质化。用低速转子（避免产生泡沫）直到获得均一的重悬液。
4. 额外加 1 mL 的透化缓冲液到匀浆中并在持续混匀条件下在 4℃ 孵育 10 分钟。
可选步骤：在沉积透化的细胞之前，可使用由赛默飞世尔科技 Pierce™组织过滤器产品(产品号 87791)提供的方案除去未匀浆的组织。
5. 在 16000×g，4℃ 条件下离心 15 分钟沉积透化后的细胞。小心地去掉含有胞质蛋白的上清液并转移到新的反应管中。
6. 将沉积物重悬于 1 mL 的增溶缓冲液中。用移液器上下抽吸以获得均质重悬液。在持续混匀条件下在 4℃ 孵育 30 分钟。
7. 在 16000×g，4℃ 条件下离心 15 分钟。将含有可溶性膜蛋白以及膜相关蛋白的上清液转移到新的反应管中。
8. 继续进行下游应用。在冰上的胞浆组分和膜组分可以立即使用或者分装后储存在-80℃条件下以备将来使用。

疑难解答

问题	可能的原因	解决方案
出现胞浆蛋白交叉污染膜蛋白组分的现象	细胞未透化	提高孵育时间或者匀浆化次数
	透化缓冲液保存方式不当	将透化缓冲液储存在-20 ℃
	透析后的细胞上清液去除不完全	确保胞浆提取物的完全去除
膜蛋白产量低	膜被透化缓冲液溶解	降低孵育时间或匀浆次数
	膜蛋白分离不完全	增加孵育时间
总蛋白产量低	细胞/组织量不足	提高起始样品使用的细胞数或组织量

相关的赛默飞世尔科技产品

87785	Halt™ 蛋白酶抑制剂混合物, 无 EDTA (100 ×), 1 mL
87786	Halt 蛋白酶抑制剂混合物 (100 ×), 1 mL
78441	Halt 蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物, 无 EDTA (100 ×), 1 mL
78440	Halt 蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物(100 ×), 1 mL
78420	Halt 磷酸酶抑制剂混合物 (100 ×), 1 mL
88665-9	Pierce 蛋白酶抑制剂片剂
23225	BCA 蛋白定量试剂盒
89888	Pierce SDS-PAGE 样品预处理试剂盒
87777	Pierce 去污剂去除离心柱, 0.5 mL
78840	亚细胞组分蛋白分离试剂盒, 用于培养细胞样品
87790	亚细胞组分蛋白分离试剂盒, 用于组织样品
87791	Pierce 组织过滤器, 250 μm, 2.5 mL, 50 次

本产品功能可保证符合所公布的产品说明书，其在产品文档、说明书或随附文件中有详细描述。对由 FDA 监管的应用，其适用性没有明确保证。本产品提供的保修有效性仅适用于受过适当产品培训的个人。除非文件中另有说明，当产品进行正常的、适当的和符合预期的使用时，本保修期限限于从发货之日起的第一年。该保修范围除了产品的最初购买者（“买方”）外不会延伸至其他任何人。任何提供给买方的模型或样本仅是说明产品的一般类型和产品质量，并不代表所有产品都与这样的模型或样本一致。

其余没有任何其它形式的保证，不管是明示的还是暗示的，包括针对其它任何目的的无限制的、适销性的默示保证，或者未授权的行为。对于在保修期内不合格的产品，购买者的特有权利仅限于要求维修、更换或在卖方允许条件下进行退款。由于（i）事故、灾害或不可抗力事件，（ii）误用、过失或买方疏忽，（iii）产品的使用不按照所提供的方法，（iv）产品的保管不当和处理不当，我们没有义务维修、更换或者进行退款。

除了在产品上明确注明或在随附文件中明确标明的，本产品仅用于研究而不能用于其他任何目的，包括没有限制的、非授权的商业用途，体外诊断应用，体外或者体内的医疗用途，或者是任何应用于人类或者动物的治疗药物。

产品说明书可在 www.thermoscientific.com/pierce 上获取。若需传真复印件, 请拨打 800-874-3723 或者联系当地代理经销商。

© 2013 赛默飞世尔科技有限公司。版权所有。Polytron 是 Kinematica AG 公司的注册商标。除非有特别说明，所有其他的商标均归赛默飞世尔科技有限公司及其子公司上所有。