

膜蛋白提取实验报告

一、实验器材及试剂

1、主要实验器材及耗材

名称	厂家	货号
涡旋混匀仪	杭州申花科技有限公司	SH-VM500S
复合转子离心机	杭州申花科技有限公司	SH-Mini7KS
移液器	德国艾本德股份公司	312000011
移液器	德国艾本德股份公司	312000020
移液器	德国艾本德股份公司	312000038
移液器	德国艾本德股份公司	312000046
移液器	德国艾本德股份公司	312000054
台式高速冷冻离心机	湖南恒诺仪器设备有限公司	2-16R
酶标仪	赛默飞世尔仪器有限公司	Multiskan FC
离心管 1.5mL (无菌无酶, 10 支/独立小包)	合肥科兔生物科技有限公司	KTL-15-W
盒装滤芯吸头 1250 μ L 加长 (无菌无酶)	合肥科兔生物科技有限公司	KTX-H200L-W
盒装滤芯吸头 200 μ L (无菌无酶)	合肥科兔生物科技有限公司	KTX-H200L-W
盒装滤芯吸头 100 μ L (无菌无酶)	合肥科兔生物科技有限公司	KTX-H100L-W
盒装滤芯吸头 20 μ L (无菌无酶)	合肥科兔生物科技有限公司	KTX-H20L-W
盒装滤芯吸头 10 μ L (无菌无酶)	合肥科兔生物科技有限公司	KTX-H10L-W
超净工作台	苏净安泰	SW-CJ-1FD
翘板摇床	杭州申花科技有限公司	SH-Y09-295

2、主要实验试剂

试剂	厂家	货号
BCA 蛋白浓度检测试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司	No.P0010
双色 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 5 \times	上海碧云天生物技术有限公司	No.P0285

二、膜蛋白提取详细实验步骤

1、蛋白提取

(1) 组织样本膜蛋白提取

- 配置含有 2%SDS 的强效 ripa 裂解液, 在使用前 10min 加入 Benzonase 核酸酶终浓度至 25 U/mL, 按照 1: 100 的体积比加入 100 \times 蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂。
- 从-80 $^{\circ}$ C取出新鲜组织, 置于冰上。快速称取 50 mg 组织, 放入预冷的 1.5 mL 或 2.0 mL



离心管中。

- c. 加入裂解液：按 10 倍体积加入 500 μL 预冷的增强型裂解液。使用手持匀浆机或玻璃匀浆器，在冰上充分匀浆。直至无明显可见组织块（约 30-60 秒）。
- d. 冰上裂解：匀浆液冰上静置裂解 20-25 分钟，期间每 5-10 分钟涡旋振荡 10 秒。
- e. 使用探头式超声破碎仪，在冰浴中进行 100W 超声 3min（超声时间：3 秒，间隔时间：5 秒）。
- f. 使用高速冷冻离心机 4°C，16,000 $\times g$ ，离心 20 分钟。用 200 μL 移液器从液面中间偏下位置小心吸取上清(避开上层漂浮的白色脂质)。
- g. 将上清转移至新的预冷离心管中，记录体积,蛋白定量（BCA 法）；
- h. 分装保存于-80°C，避免反复冻融。

（2）细胞样本蛋白提取

- a. 贴壁培养的细胞，吸去培养基后，每孔加入 2mL 预冷 PBS 洗两次，弃尽上清；
- b. 加入适量 0.25%-EDTA 胰蛋白酶消化液，37°C 消化，消化完成后将细胞及培养液移至离心管中，1000 转/分离心 5 min，再加入 1mL 预冷 PBS 重悬，1000 转/分离心 5 min 洗两次；
- c. 配置含有 2%SDS 的强效 ripa 裂解液，在使用前 10min 加入 Benzonase 核酸酶终浓度至 25 U/mL，按照 1：100 的体积比加入 100*蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂。
- d. 细胞洗涤后，弃尽上清，每管加入 200 μL 上述配制好的冷 Lysis Buffer；
- e. 置于 4°C 摇床平台上，温和振荡 15 min；
- i. 使用探头式超声破碎仪，在冰浴中进行 100W 超声 3min（超声时间：3 秒，间隔时间：5 秒）。
- f. 14,000rpm，4°C 离心 15min，取上清为全蛋白提取物，蛋白定量（BCA 法）；
- g. 分装保存于-80°C，避免反复冻融。

2、蛋白定量

（1）蛋白标准品的准备

- a. 取 1.2ml 蛋白标准配制液加入到一管蛋白标准(30mg BSA)中，充分溶解后配制成 25mg/ml 的蛋白标准溶液。配制后可立即使用，也可以-20°C 长期保存。
- b. 取适量 25mg/ml 蛋白标准，稀释至终浓度为 0.5mg/ml。例如取 20 μl 25mg/ml 蛋白标准，加入 980 μl 稀释液即可配制成 0.5mg/ml 蛋白标准。蛋白样品在什么溶液中，标准品也



宜用什么溶液稀释。但是为了简便起见，也可以用 0.9%NaCl 或 PBS 稀释标准品。稀释后的 0.5mg/ml 蛋白标准可以-20°C长期保存。

(2) BCA 工作液的配制

根据样品数量，按 50 体积 BCA 试剂 A 加 1 体积 BCA 试剂 B(50:1)配制适量 BCA 工作液，充分混匀。例如 5mlBCA 试剂 A 加 100 μ l BCA 试剂 B，混匀，配制成 5.1ml BCA 工作液。BCA 工作液室温 24 小时内稳定。

(3) 蛋白浓度检测

- a. 将标准品按 0、1、2、4、8、12、16、20 μ l 加到 96 孔板的标准品孔中，加标准品稀释液补足到 20 μ l，相当于标准品浓度分别为 0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5mg/ml。
- b. 加适当体积样品到 96 孔板的样品孔中。如果样品不足 20 μ l，加标准品稀释液补足到 20 μ l。请注意记录样品体积。
- c. 各孔加入 200 μ l BCA 工作液，37°C放置 20-30 分钟。
- d. 用酶标仪测定 A562，或 540-595nm 之间的波长的吸光度。
- e. 根据标准曲线和使用的样品体积计算出样品的蛋白浓度。
- f. 根据定量结果调整蛋白浓度，确保上样时各泳道蛋白总量一致。
- g. 根据样品体积按照 1: 5 的体积比加入 5 \times 双色 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液，混匀后于 37°C孵育 30min。
- h. 将变性后的蛋白样品放在-20 摄氏度冰箱冷冻保存。