



## 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	3120000011
移液器	德国艾本德股份公司	3120000020
移液器	德国艾本德股份公司	3120000038
移液器	德国艾本德股份公司	3120000046
移液器	德国艾本德股份公司	3120000054
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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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、全蛋白提取详细实验步骤

#### 1、蛋白提取

##### (1) 组织样本蛋白提取

- a. 组织称重, 切小块放入管中。
- b. 配置含抑制剂的蛋白质抽提试剂 (1ml 抽提试剂中加入 5  $\mu$ l 蛋白酶抑制剂混合液, 5  $\mu$ l PMSF 和 5ul 磷酸酶混合液)。



- c. 加入预冷的含抑制剂的蛋白质抽提试剂（250mg 组织中加入 1ml 抽提试剂）。
- d. 用匀浆器每次 30 秒低速匀浆，每次匀浆间隔冰浴 1 分钟，至组织完全裂解。
- e. 裂解液于预冷的离心机中 14,000xg 离心 15 分钟。上清液立刻转移入新的离心管中保存待用。

## (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. 在每 1mL 预冷 Lysis Buffer 中加入 10 $\mu$ L 磷酸酶抑制剂，1 $\mu$ L 蛋白酶抑制剂和 5 $\mu$ L 100mM PMSF，混匀，冰上保存数分钟待用；
- d. 细胞洗涤后，弃尽上清，每管加入 200 $\mu$ L 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；
- 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 $\mu$ l 25mg/ml 蛋白标准，加入 980 $\mu$ l 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 5ml BCA 试剂 A 加 100 $\mu$ 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 $\mu$ l 加到 96 孔板的标准品孔中，加标准品稀释



- 液补足到 20 $\mu$ 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 $\mu$ l, 加标准品稀释液补足到 20 $\mu$ l。请注意记录样品体积。
  - c. 各孔加入 200 $\mu$ l BCA 工作液, 37 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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。

仅供科研用途, 不可用于临床诊断!