

# 实验步骤: 提取胞质与胞膜蛋白

## 缓冲液成分

### 缓冲液 1

	浓度
HEPES (pH 7.4)	50 mM
NaCl	150 mM
Saponin	0.05%
PMSF	1 mM
Leupeptin	5 µg/ml
Aprotinin	2 µg/ml
Pepstatin A	1 µg/ml

需在使用前新鲜制备，并放置于冰上。

### 缓冲液 2

	浓度
HEPES (pH 7.4)	50 mM
NaCl	150 mM
IGEPAL <sup>®</sup> CA-630 solution	1%
PMSF	1 mM
Leupeptin	5 µg/ml
Aprotinin	2 µg/ml
Pepstatin A	1 µg/ml

需在使用前新鲜制备，并放置于冰上。

## 缓冲液使用

### 缓冲液1和缓冲液2的建议使用量

缓冲液	细胞数	体积 (µl)
缓冲液 1	$5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$	300-1000
	$1 \times 10^5$	100-200
缓冲液 2	$5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$	500-1500
	$1 \times 10^5$	100-300

#### 注意:

1. 缓冲液体积可能会因为细胞类型(及细胞大小)而异，应由用户调整优化。
2. 如果发现总蛋白质浓度较低，请相应地调低缓冲液的体积。

## 方法

### A. 提取胞质蛋白

1. 从孵育箱中取出培养皿，将细胞收集到离心管中。
2. 计数细胞，然后将所需的细胞数量转移至新的离心管中。
3. 在室温离心200 xg 5分钟，去除上清液，用1X PBS轻轻让细胞重新悬浮。
4. 在室温离心200 xg 5分钟，去除上清液。
5. 用1X PBS轻轻让细胞重新悬浮，重复步骤4，确保去除所有清洗液，仅留下细胞沉淀。
6. 加入适当体积的缓冲液1，然后轻轻地重悬细胞，避免形成泡泡。
7. 将细胞裂解液转移至新的离心管中，将此试管放在4 °C 10分钟。
8. 在4 °C离心2,000 xg 10分钟，将上清液取(此为胞质蛋白)至新的微量离心管，放置于冰上。
9. 确认已从管中完全取出胞质部分，离心管底部的沉淀物，可以再按以下步骤提取胞膜蛋白。

### B. 提取胞膜蛋白

10. 加入适量的缓冲液2在上部分的离心沉淀物中，然后轻轻重悬。
11. 将试管放在冰上30分钟。
12. 在4 °C离心7,000 xg 10分钟。
13. 将上清液(此为胞膜蛋白，内含膜胞器)取至新的离心管并放置于冰上。