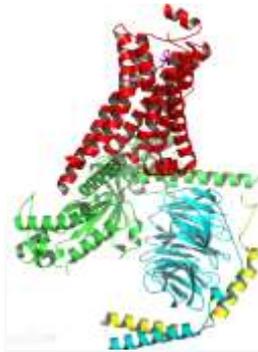


使用超速离心机进行 G-蛋白偶联受体的纯化

【使用 himac CP-NX 超速离心机及 P40ST 水平转头】



G-蛋白偶联受体 (GPCRs) 主要位于细胞膜，并接收多种不同的信息，如光，味道，神经递质，及其它外部信号，并且这些信号通过 G-蛋白转到细胞内。众所周知，GPCRs 及相关蛋白与多种疾病密切相关，并作为被研究目标在新药开发中起到关键作用。GPCRs 也在历史上两次诺贝尔奖 (1994 年的生理/医学奖及 2012 年的化学奖) 中吸引了相当的关注。GPCRs 是目前最吸引全球关注的蛋白之一。

本文将介绍从脂质筏分离 G-蛋白的离心方法。由于脂质筏可抵抗表面活性剂，我们将脂质筏溶在表面活性剂中，并通过使用蔗糖梯度液等密度梯度离心进行分离纯化 G-蛋白。通过脂类的不同密度将该类蛋白与膜的其它部分分开并纯化。

详细步骤：

1. 原始样品：鼠小脑颗粒细胞培养液
2. 样品准备：将鼠小脑颗粒细胞混悬于 2ml 含有 1% Triton X-100 的 TNE 缓冲液中，匀浆该混悬液，再加等量的含 80% 蔗糖液的 2ml TNE 缓冲液，混匀。
3. 离心设备：

主机及转头及辅助设备：

himac 超速离心机 CP-NX 及水平转头 P40ST, 并可选择使用 himac 的 DGF-U 密度制备仪进行梯度液自动制备



CP100NX



P40ST 转头



DGF-U 密度制备仪

仪器(北京)有限公司
朝阳区天畅园7号楼(100107)

t 010-64010651
f 010-64060202
e TIL_LS@techcomp.cn
w www.techcomp.cn

◆ himac 超速离心机：

- √ 最高转速 100000rpm
- √ 最大 RCF803000 xg
- √ 实时运行曲线及记录
- √ 远程监控和诊断
- √ 驱动系统十年保用
- √ 转头寿命自动管理
- √ 用户管理和密码锁控制
- √ 符合 GMP 要求

◆ DGF-U 密度梯度制备仪：

可在不同的离心管内自动制作梯度液，而且离心分离后样品及梯度液可自动连续取出，并可通过连接到带连续流动池的紫外分光光度计及馏分器，实现自动检测及收集

4. 离心条件：

P40ST 水平转头 (40000rpm, 13ml x 6)

离心管：13PA 管

转速：40000rpm (RCF：284000xg)

离心时间：17 小时

温度：4°C

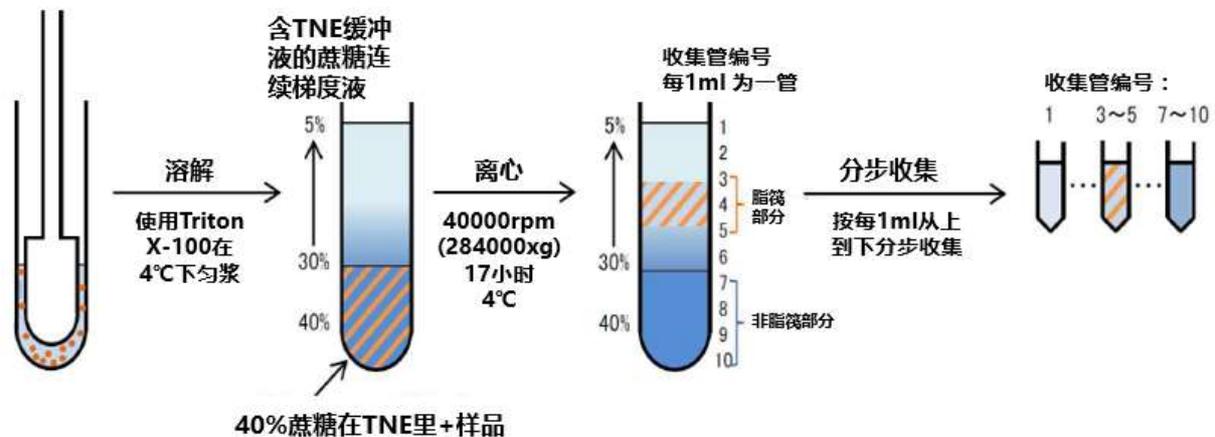
加减速速率：8 加/8 减

样品量：4ml

密度梯度液：6ml 5-30%蔗糖的连续密度梯度液

5. 操作过程：

将 4ml 样品加到 13PA 管底部，然后将 6ml 含有 TNE 缓冲液的 5-30%蔗糖梯度液加到样品层上。再将 P40ST 转头放置到 CP100NX 上，在 40000rpm (200000xg) 下离心 17 小时。离心结束后，按每 1ml 从上到下分步收集梯度液，并分别放置在标注好的第 1-10 管内。含有 G-蛋白的脂筏层 DRM (抗 detergent 的脂膜) 将在第 3-5 管，而非脂筏层将在第 7-10 管。详见下图示例：



6. 所用试剂：



TNE 缓冲液 (25mM Tris-HCL , 150mM NaCl , 1mM EGTA , pH7.5)

TNE 缓冲液 + 1% Triton X-100

80% 蔗糖在 TNE 缓冲液内

30%蔗糖在 TNE 缓冲液内

5%蔗糖在 TNE 缓冲液内

如有任何其它相关问题，请随时联系天美创科仪器（北京）有限公司。