

红细胞膜的提取

修订人	周靖娥	审核人		批准人	
修订日期	2014/11/17	审核日期		批准日期	
颁发部门		分发部门		生效日期	

1. 仪器设备：

名称	厂商	型号
离心机	Thermofisher	Heraeus Multifuge X1R
1ml 注射器	上海康德莱企业发展集团 股份有限公司	
2mlEP 管		
15ml 离心管	Corning	
50ml 离心管	Corning	
200ul 移液枪	Eppendorf	
100ul 移液枪	Eppendorf	
1000ul 移液枪	Eppendorf	

2. 试剂耗材：

名称	厂商	货号	批次
C57 鼠			
戊巴比妥钠	Lot.No.WS20080810		
肝素钠	Aladdin	H104201-1g	9041-08-1
EDTA	国药集团化学试剂有限公司	10009617	20140305
PBS 缓冲液	今迈生物	AR0030	
20*PBS	今迈生物		
生理盐水	应天成	H20003336	A12020806

附：以上试剂的配制方法

- 2.1 2%戊巴比妥钠：精密称取 2.0g 戊巴比妥钠粉末于烧杯中，量取 80ml 双蒸水，搅拌后转移至 100ml 容量瓶中，量取 20ml 无水乙醇洗涤烧杯后转移至 100ml 容量瓶中，定容至 100ml，过滤（0.22um 滤膜）除菌后分装，放置于 4℃冰箱保存。
- 2.2 0.5%肝素钠溶液：精密称取 0.05g 肝素钠粉末于 15ml 离心管中，取 10ml 生理盐水加入离心管，充分震荡摇匀，4 摄氏度冰箱保存。
- 2.3 0.2mM EDTA 溶液：精密称取 0.0234g EDTA 于 500ml 试剂瓶中，量取 400ml 蒸馏水，加入试剂瓶，充分摇匀，加适量磷酸氢二钠或氢氧化钠调节 pH 至 8.0，水浴锅加热至 40 摄氏度，使 EDTA 充分溶解，室温保存。
- 2.4 1*PBS 溶液：取定量规格的 PBS 缓冲液粉末于 2000ml 蒸馏水中溶解，4℃保存。
- 2.5 20*PBS 溶液：取定量规格的 PBS 缓冲液粉末于 100ml 蒸馏水中溶解，4℃保存。

3. 操作步骤：

3.1、准备工作：

3.1.1、准备足够的 2ml 的 EP 管和 1ml 注射器，并用肝素钠生理盐水荡洗；1000ul 的移液枪；记号笔；手术剪及止血钳。

3.1.2 • 离心机预冷至 4℃，PBS 预冷至 4℃。

3.2 实验步骤：

3.2.1、取 20g 左右重量的小鼠，正确捉持后腹腔注射 0.2ml 的 2%戊巴比妥钠溶液，待完全麻醉后，剖开剑突及以上部位，暴露心脏后，从左心室进针，取用肝素钠荡洗过的注射器取血（大约 1ml），取血后转移至 2ml 含肝素钠的 EP 管中。

3.2.2、将全血放入离心机中离心，900g,20min,

3.2.3、弃去上层清液，留下暗红色沉淀，取沉淀 3 倍体积的 1*PBS 放入，并均匀吹散，放入离心机离心 2500g,15min.此为第一次洗涤。

3.2.4、重复 3.2.3 步骤，放入离心机离心 2500g,15min.此为第二次洗涤。

3.2.5、重复 3.2.3 步骤，放入离心机离心 2500g,15min.此为第三次洗涤。

3.2.6、弃去上层清液，留下沉淀，取沉淀等量的 1*PBS 放入离心管中吹散，

取 950ul 的 0.2mM 的 EDTA 放入离心管混匀, 待充分溶血后, 加入 50ul20*PBS。

3.2.7、配平后放入离心机离心: 21000g, 7min. 此为第一次溶血洗涤。

3.2.8、重复 3.2.6 的步骤, 配平后放入离心机中离心, 21000g, 7min. 此为第二次溶血洗涤。

3.2.9 • 重复 3.2.6 的步骤, 配平后放入离心机中离心, 21000g, 7min. 此为第三次溶血洗涤。

3.2.10 弃去上层清液, 留下沉淀于离心管中, 加入 950ul 0.2mM 的 EDTA, 充分混匀, 配平后离心: 21000g, 7min.

3.2.11 弃去上层清液, 加入 1ml 0.2mM 的 EDTA 重悬, 即为红细胞膜悬浮液。

注意事项:

1. 如步骤 3.2.3 中的加入 3 倍量的 1*PBS, 只需目测体积即可, 之后的每次洗涤不用每次换算当量;
2. 如步骤 3.2.6 中充分溶血, 即样品不再是暗红色而是通红, 如觉得未溶血, 可适量加入 0.2mM EDTA;
3. 最后重悬 0.2mM EDTA 的量可根据样品浓度调整。