



细胞核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒

货号: R33015

规格: 50T, 100T

保存温度: -20℃保存, 有效期 12 个月。

产品简介:

细胞核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒(Nuclear and Cytoplasmic Protein Extraction Kit)用于从哺乳动物组织和培养细胞中提取核蛋白或胞浆蛋白, 提取制备过程简便。制备的核蛋白和胞浆蛋白能保持天然活性, 并且纯度较高, 具有非常高的蛋白提取效率。提取的蛋白可用于进一步的转录因子活性分析、凝胶阻滞实验(gel shift assay)、免疫共沉淀、WesternBlot、ELISA、酶活性测定等后续蛋白质研究。

本试剂盒是通过提取缓冲液在低渗透压条件下, 使细胞充分膨胀, 破坏细胞膜, 释放出细胞浆蛋白, 然后通过离心得到完整的细胞核; 再用高盐的细胞核蛋白抽提试剂抽提得到细胞核蛋白。一般情况下, 胞浆蛋白与核蛋白之间的交叉污染低于 10%。

产品组成:

组分	R33015-50T	R33015-100T
Buffer A	20ml	2×20mL
Buffer B	0.5ml	2×0.5ml
Buffer C	5ml	2×5ml

使用方法:

1.准备溶液: 常温溶解试剂盒中的试剂, 溶解后立即放置在冰上, 混匀。取适当量的细胞浆蛋白抽提试剂 A 和细胞核蛋白抽提试剂 C, 在使用前加入 PMSF 溶液(使得 PMSF 终浓度为 1 mM)和/或磷酸酶抑制剂(自备, 试剂盒不提供), 随后立即放于冰上待用。

2.准备细胞:

2.1 对于贴壁细胞: 用 PBS 漂洗一遍, 弃 PBS; 再加入适量 PBS, 用细胞刮刀刮下细胞, 或用 0.02% EDTA (0.5 mM) 溶液处理细胞使细胞不再贴壁很紧, 并用移液器吹打下细胞。450 g 4℃ 离心 5 min 收集细胞, 尽最大努力吸尽上清, 留下细胞沉淀备用。尽量避免用胰酶消化细胞, 以免胰酶降解需抽提的目的蛋白。

2.2 对于悬浮细胞: 450 g 4℃ 离心 5 min 收集细胞, 用 PBS 洗一遍, 离心收集细胞,



尽最大努力吸尽上清，留下细胞沉淀备用。

3.胞浆蛋白提取:

3.1 每 20 μ l 细胞沉淀加入准备好的 200 μ l 细胞浆蛋白抽提试剂 A(对于二百万即 2×10^6 HeLa 细胞，其细胞沉淀的体积大约为 20 μ l 或 40mg。)，用 1 ml 吸头吹打重悬细胞沉淀 5-10 次，把细胞沉淀完全悬浮并分散开，冰浴 5 分钟。

3.2 关键步骤：加入 10 μ l 细胞浆蛋白抽提试剂 B（按照细胞浆蛋白抽提试剂 A 体积的 1/20 加入），混匀，冰浴 5-10 分钟。

注 1：此步骤尽量不要漩涡震荡沉淀，否则得到的细胞浆蛋白可能会污染核蛋白。

注 2：裂解缓冲液对不同细胞的裂解能力有不同，敏感细胞裂解 5 分钟足够，其他细胞冰浴时间不要超过 10 分钟。

3.3 4℃ 16000g 离心 5 分钟，取 80%上清即为胞浆蛋白，保存备用。

注：吸取上清时千万不要触及沉淀，可以只取 80%体积上清，以免胞浆蛋白中污染细胞核。每 2×10^6 细胞用 200 μ l 细胞浆蛋白抽提试剂 A 裂解后获得的上清，其细胞浆蛋白浓度约为 1-2 μ g/ μ l，不同细胞略有不同。

4. 细胞核蛋白提取:

4.1 彻底去除步骤 3.3 离心管内上清，沉淀中再次加入 200 μ l 细胞浆蛋白抽提试剂 A（含 PMSF 和 DTT），用 1 ml 吸头吹打重悬沉淀至沉淀完全散开（注：涡旋震荡不易悬浮沉淀），冰浴 5 分钟；4℃ 16000g 离心 5 分钟，彻底去除上清，沉淀即为完整的细胞核。

注：此步骤目的是彻底漂洗沉淀中残余的未裂解细胞，可以大大提高细胞核的纯度；上清必须彻底去除干净，否则会导致细胞核蛋白中污染胞浆蛋白。

4.2 沉淀中加入 100 μ l 细胞核蛋白抽提试剂（确保已经添加 PMSF），吸头重悬沉淀，4℃ 旋转混匀 30 min，至最后得到的溶液无可见悬浮物。

注：如不能旋转混匀，可以冰浴 30 min，每隔 5 分钟涡旋混匀一次。

4.3 4℃ 16,000g 离心 10 分钟，立即吸取上清至一预冷的离心管中，即为抽提得到的活性核蛋白。可以立即使用，也可以 -80℃ 冻存。每 2×10^6 细胞提取的细胞核蛋白浓度约为 1-3 μ g/ μ l（可以使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒定量），不同细胞略有不同。

5.对于新鲜组织:

5.1 组织匀浆：把组织尽可能切成非常细小的碎片。按照 20:1 的比例混合细胞浆蛋白抽提试剂 A 和 B(例如 200 μ l 细胞浆蛋白抽提试剂 A 中加入 10 μ l 细胞浆蛋白抽提试剂 B)，并加



入 PMSF 至终浓度为 1mM 配制成组织匀浆液。按照每 30 mg 组织加入大约 200 μ l 组织匀浆液的比例在玻璃匀浆器内冰浴充分匀浆。

注: 匀浆液可以适当调整加入体积, 少加可以提高蛋白浓度, 多加可以更加充分地研磨。

5.2 组织裂解: 匀浆后把匀浆液转移到离心管内, 冰浴放置 15 分钟, 间歇混匀。

5.3 提取组织细胞浆蛋白: 4℃ 16000 g 离心 5 分钟, 取 80%上清即为胞浆蛋白, 保存备用。

注: 吸取上清时千万不要触及沉淀, 可以只取 80%体积上清, 以免胞浆蛋白中污染细胞核。

5.4 组织细胞核蛋白提取: 彻底去除步骤 5.3 中的上清, 得到的沉淀按照步骤 4 进行。
新鲜的肝脏组织用本产品裂解后获得的上清, 其细胞浆蛋白浓度约为 1-5 μ g/ μ l, 细胞核蛋白浓度约为 1-5 μ g/ μ l, 不同状态的不同组织有所不同。

注意事项:

- 1、所有的试剂及器具均需预冷后使用。
- 2、蛋白提取推荐添加蛋白酶抑制剂; 研究蛋白磷酸化, 需要添加磷酸酶抑制剂。
- 3、蛋白定量推荐使用 BCA 方法, 可以采用我公司生产的 BCA 蛋白浓度测定试剂盒。
- 4、本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 5、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。