

细胞核蛋白与细胞浆蛋白提取试剂盒

Cat.No:WB3101

Size: 50T

产品介绍

细胞研究常需分离不同细胞组分，其中细胞核、细胞浆蛋白检测应用最为广泛。本核浆蛋白抽提试剂盒操作简便，可从培养细胞或新鲜组织中分步提取胞浆蛋白与核蛋白。本试剂盒采用低渗裂解策略：细胞在胞蛋白提取试剂 A、B 作用下细胞膨胀、细胞膜破裂，释放胞浆蛋白；离心收集细胞核沉淀后，通过高盐核蛋白提取试剂洗脱核蛋白。提取产物适用于蛋白免疫印迹、免疫沉淀等各类后续蛋白实验。

组分	规格
浆蛋白提取试剂 A	15ml
浆蛋白提取试剂 B	0.5ml
核蛋白提取试剂	2.5ml

操作步骤

- 1、将融化后的浆蛋白提取试剂 A 和核蛋白提取试剂放置于冰上，按样本量分别取出浆蛋白提取试剂 A 和核蛋白提取试剂，按体积比添加至 1X 蛋白酶抑制剂（推荐货号：P001）。
- 2、A. 对于**贴壁细胞**：4℃，500g 离心 5min 以沉淀细胞。用预冷的 PBS 洗涤两遍弃干净上清。
B. 对于**悬浮细胞**：使用 PBS 漂洗细胞 1 次，离心收集细胞，尽可能吸除全部上清，保留细胞沉淀备用。。
C. 对于**新鲜组织**：
a). 将组织尽可能切成非常细小的碎片。按照 20:1 的比例混合适当量的浆蛋白抽提试剂 A 和 B(例如 200ul 浆蛋白抽提试剂 A 中加入 10u 浆蛋白抽提试剂 B)（**确认已添加蛋白酶抑制剂**）。按照每 60mg 组织加入 200ul 组织匀浆液的比例混合组织和组织匀浆液(对于不超过 30mg 的组织样品，仅需加入 100ul 组织匀浆液)，并在玻璃匀浆器内充分匀浆。匀浆需在冰浴或 4℃进行。
b). 匀浆后把匀浆液转移到塑料离心管内，冰浴放置 15min。
c). 4℃，1500g 离心 5min。把上清转移至一预冷的塑料管中，是抽提得到的部分细胞浆蛋白。（**吸上清时千万不要触及沉淀。**）

d). 对于沉淀,到了这一步已经充分匀浆,但很多细胞还没有破碎。接下去按照使用说明书的步骤 3-12 步骤开始操作,

(即把沉淀当做已经离心收集好的细胞沉淀操作,继续提取得到细胞浆蛋白和核蛋白)。

3、每 20ul 细胞沉淀加入 200ul 细胞浆蛋白抽提试剂 A(已添加蛋白酶抑制剂)。(例如对于二百万 HeLa 细胞,其细胞沉淀的体积大约为 20ul 或 40mg。)

4、最高速剧烈涡旋 5-10s,把细胞沉淀完全悬浮并分散开。(如果细胞沉淀没有完全悬浮并分散开,可以适当延长涡旋时间。)

5、冰浴 10-15min。

6、加入细胞浆蛋白抽提试剂 B 10ul。最高速涡旋 5-10s,冰浴 1min。

7、最高速涡旋 5-10s, 4℃ 12,000-16,000g 离心 5min。

8、立即吸取上清至一预冷的塑料管中,即为抽提得到的细胞浆蛋白。可以立即使用,也可以冻存-70℃保存备用。(千万不要触及沉淀,可以在沉淀上方保留极小体积的上清,以免触及沉淀。)

9、对于沉淀,完全吸尽残余的上清,加入 50ul 细胞核蛋白抽提试剂(已添加蛋白酶抑制剂)。

10、最高速涡旋 15-30s,把细胞沉淀完全悬浮并分散开。然后放回冰浴中,每隔 1-2min 再高速涡旋 15-30s,共 30min。

11、4℃, 12,000-16,000g 离心 10min。

12、立即吸取上清至一预冷的塑料管中,即为抽提得到的细胞核蛋白。可以立即使用,也可以冻存-70℃保存备用。

运输及保存方式

-20℃保存,冰袋运输,至少 1 年有效;

注意事项

1. 需取新鲜样本制备以及建议低温下实验操作。
2. 蛋白提取试剂的用量可根据细胞量等比例扩大。
3. 制备样品前,浆蛋白提取试剂 A 和核蛋白提取试剂都需加入蛋白酶抑制剂(推荐货号: P001)。用于磷酸化抗体的可选择蛋白酶加磷酸酶抑制剂混合物(推荐货号: P002)。
4. 本试剂盒为低温运输,使用前需室温或水浴(低于 30℃)融化,不可加热融化。
5. 本产品仅限科研使用。

