

核质蛋白提取试剂盒

产品货号: 26918

产品规格: 50 rxns/100 rxns

产品简介:

不同蛋白在细胞内发挥功能的场所不同,即亚细胞定位不同,其中核蛋白和胞质蛋白相关研究较多。细胞核蛋白主要参与基因复制、转录调控等生命过程,细胞质蛋白主要涉及物质转运、物质代谢、信号传递等功能。

核质蛋白提取试剂盒能够从哺乳动物的细胞或组织中逐步分离、制备高纯度的核蛋白和胞质蛋白,整个过程约90min。提取得到的蛋白可用于Western Blot, EMSA, Footprinting, 报告基因检测及酶活力测定等后续操作。

产品组成:

产品名称	50T	100T	保存条件
细胞质提取缓冲液A	10ml	20ml	2-8℃
细胞质提取缓冲液B	550 μ l	1.1ml	2-8℃
核提取缓冲液	5ml	10ml	2-8℃

适用范围:

本产品适用于从多种新鲜或冻存的动物细胞/组织中提取细胞核蛋白、细胞质蛋白。

实验流程:

◆ 细胞样品

- 细胞获取:
 - 贴壁细胞: 弃去细胞培养液上清, 加入适量1×PBS, 用细胞刮刮下细胞, 将细胞从培养皿中移出, 3,000rpm (900×g), 4℃离心3min, 弃上清。
 - 悬浮细胞: 3,000rpm (900×g), 4℃离心3min, 弃上清。
- 清洗细胞: 用预冷的1×PBS洗涤细胞2次, 3,000rpm (900×g), 4℃离心3min, 尽可能吸尽上清, 留下细胞沉淀备用。
- 向细胞沉淀中加入已添加蛋白酶抑制剂(工作浓度为1×)的细胞质提取缓冲液A。按照Table 1所推荐的试剂体积进行细胞质和细胞核蛋白提取(对于磷酸化蛋白, 还需额外加入磷酸酶抑制剂, 工作浓度为1×)。

Table 1. 不同细胞量推荐的提取试剂体积

细胞沉淀体积(μ l)	细胞质提取缓冲液A(μ l)	细胞质提取缓冲液B(μ l)	核提取缓冲液(μ l)
10	100	5.5	50
20	200	11	100
50	500	27.5	250
100	1000	55	500

▲ 以HeLa细胞为例, 2×10^6 个细胞的沉淀体积大约为20 μ l。

- 最高速剧烈涡旋10sec, 使细胞沉淀完全悬浮并分散开, 冰上孵育15min。

▲ 若细胞沉淀未完全悬浮并分散开, 可适当延长涡旋时间。

- 加入细胞质提取缓冲液B, 最高速剧烈涡旋5sec, 冰上孵育4min。

▲ 若细胞质部分存在核蛋白, 应减少孵育时间; 若细胞核部分存在质蛋白, 应延长孵育时间。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

6. 高速剧烈涡旋5sec, 13,300rpm (17,000×g), 4℃离心30sec。
7. 立即将上清(细胞质提取物)转移至干净预冷的EP管中, 立即使用或-80℃冻存备用。
▲ 转移时需在沉淀上方保留适当体积的上清, 以免触及沉淀, 造成核质交叉污染。
8. 弃去剩余上清, 用预冷1×PBS清洗细胞核沉淀, 最高速剧烈涡旋5sec, 13,300rpm (17,000×g), 4℃离心30sec, 尽可能吸尽上清。
9. 加入已添加蛋白酶抑制剂(工作浓度为1×)的核提取缓冲液。最高速剧烈涡旋30sec, 使沉淀完全悬浮并分散开, 冰上孵育30min, 期间最高速剧烈涡旋30sec, 共3次。
10. 13,300 rpm (17,000 ×g), 4℃离心10min。
11. 立即将上清(细胞核提取物)转移至干净预冷的EP管中, 立即使用或-80℃冻存备用。

◆ 组织样品

1. 把组织尽可能剪成小的碎片(也可将组织置于适量1×PBS中, 使用注射器的活塞柄进行研碎), 3,000rpm (900×g), 4℃离心3min, 收集碎片沉淀。
2. 向组织碎片中加入已添加蛋白酶抑制剂(工作浓度为1×)的细胞质提取缓冲液A, 使用Dounce均质器或组织研磨机, 在冰上进行充分匀浆。按照Table 2所推荐的试剂体积进行细胞质和细胞核蛋白提取(对于磷酸化蛋白, 还需额外加入磷酸酶抑制剂, 工作浓度为1×)。

Table 2. 不同组织量推荐的提取试剂体积

组织重量(mg)	细胞质提取缓冲液A(μl)	细胞质提取缓冲液B(μl)	核提取缓冲液(μl)
20	200	11	100
40	400	22	200
80	800	44	400
100	1000	55	500

3. 匀浆后把匀浆液转移至干净预冷的EP管中, 冰上孵育15min。
4. 加入细胞质提取缓冲液 B, 最高速剧烈涡旋5sec, 冰上孵育4min。
5. 最高速剧烈涡旋5sec, 13,300rpm (17,000×g), 4℃离心30sec。
6. 立即将上清(细胞质提取物)转移至干净预冷的EP管中, 立即使用或-80℃冻存备用。
▲ 转移时需在沉淀上方保留适当体积的上清, 以免触及沉淀, 造成核质交叉污染。
7. 对于组织沉淀, 可按照实验流程/细胞样品/Step 3 - Step 11操作得到细胞质蛋白和细胞核蛋白。提取得到的细胞质蛋白可以和步骤6中提取得到的细胞质蛋白合并, 也可弃去。
▲ 绝大多数组织沉淀已被均质化为单细胞浆, 但此时大多数细胞还没有被裂解, 需进一步对细胞裂解并进行蛋白提取。

注意事项:

1. 需自备蛋白酶抑制剂, 如果检测磷酸化修饰的蛋白, 需另外自备磷酸酶抑制剂。
2. 蛋白提取的所有步骤均需在冰上进行。
3. 使用本产品抽提得到的细胞核蛋白与细胞质蛋白均可使用与洗涤剂兼容的Bradford蛋白质定量试剂盒测定蛋白浓度。
4. 对于细胞样品, 如果每个样品的数量不超过 2×10^6 个细胞, 本试剂盒可以抽提50个样品或者100个样品; 对于组织样品, 如果每个样品的重量不超过20mg, 本试剂盒可以抽提25个样品或者50个样品。
5. 当细胞质和细胞核之间的交叉污染率在10%左右, 其纯度满足大多数涉及细胞核提取物的实验。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com