

细胞核蛋白和胞浆蛋白制备试剂盒(Nuclear-Cytosol Extraction Kit) P1200

描述: 用于从哺乳动物组织和培养细胞中提取核蛋白和/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, 并且纯度高。提取的蛋白适于转录因子活性分析、凝胶阻滞实验(gel shift assay, EMSA)、免疫共沉淀、酶活性测定, 也适于 Western Blot 实验。

组份:

试剂盒组成	50 次制备	100 次制备	提取	储存条件
Cytosol Extraction Buffer A (CEB-A)	25 ml	50 ml		4 °C, 1 year
Cytosol Extraction Buffer B (CEB-B)	1.5 ml	2×1.5 ml		4 °C, 1 year
Nuclear Extraction Buffer (NEB)	5 ml	10 ml		4 °C, 1 year

温馨提示:

- 操作应在冰浴中进行, 试剂需提前预冷。
- 根据大致的细胞数, 或大致估计离心后的细胞体积(Packed cell volume, PCV)来确定试剂的加入量。PCV 因细胞类型不同而有所差异。细胞数、PCV 与试剂加入量之间的对应关系, 参见下表:

培养皿直径	35 mm or 或 1 孔六孔板	60 mm	10 cm
培养皿面积	10 cm ²	30 cm ²	75 cm ²
细胞计数	5 × 10 ⁵	1 × 10 ⁶	5 × 10 ⁶
相当于 PCV(μl)	5	10~20	50~100
加入 CEB-A (μl)	25	50~100	300~500
加入 CEB-B (μl)	1.2~1.5	3~6	3~6
加入 NEB (μl)	5~10	20	100

操作步骤

- 裂解: (1) 培养细胞,** PBS 洗涤细胞两次, 根据细胞计数, 或者估计离心后的细胞体积 PCV。每 1 × 10⁶ 个细胞加入 50~100μl 的 CEB-A, 刮下细胞转移至预冷的 1.5ml 离心管; 或者每体积 PCV 细胞加入 5 倍 PCV 体积的 CEB-A (即 10~20 μl PCV 的细胞加 50~100μl 的 CEB-A), 剧烈振荡重悬。
裂解: (2) 组织样本, 精确称重后剪成小块, PBS 洗涤。通常每 10 mg 动物组织相当于 1 × 10⁶ 个细胞, 需加入 50~100μl CEB-A, 参照上表按比例加入。在冰上使用玻璃匀浆器匀浆组织, 通常需要 20~40 次上下抽动匀浆, 弃去筋膜组织。切记勿用高速电动匀浆器或超声破碎组织避免破坏细胞器结构。
- 裂解产物转移至预冷的 1.5ml 离心管, 剧烈振荡 30 秒, 冰浴 10~15min, 期间每 5 分钟振荡 15 秒。
- 可选步骤:** 根据步骤 2 裂解物体积, 加入 1/20 体积的 CEB-B, 振荡 10 秒, 冰浴 1min (加入 CEB-B 可去除部分核膜蛋白, 适于制备高纯度的核蛋白用于 EMSA 凝胶阻滞实验等, 但可使胞浆蛋白出现少量的膜蛋白污染。若制备高纯度胞浆蛋白可跳过此步骤。若制备核蛋白仅用于普通的 Western Blot 目的, 则无须高纯度核蛋白, 也可省略此步骤。
- 胞浆蛋白组分的制备:** 将步骤 2 或步骤 3 的上清, 12000g 4 °C 离心 5min, 勿触动沉淀, 将上清转移到新管, 此即胞浆蛋白组分, 可立即使用或 -20~-70°C 保存。
- 胞核粗提组分的制备:** 取第步骤 4 的原离心管, 12000g 4 °C 瞬时离心, 尽量吸除上清, 保留沉淀。加入 100μl CEB-A 和 5 μl CEB-B, 振荡 10 秒, 重悬沉淀, 冰浴 1min, 1000g 5min, 弃上清。再次加入 100μl CEB-A 和 5 μl CEB-B 重悬沉淀冰浴 1min, 1000g 5min, 尽弃上清, 保留沉淀。
- 胞核蛋白的制备:** 加 50~100μl 预冷 NEB 重悬步骤 5 的离心沉淀, 剧烈振荡 15 秒, 冰上 30min, 期间每 10 min 振荡 15 秒。12000g 5min, 上清液含核蛋白成分, 其中含有 25% 的甘油; 可立即使用或 -20~-70°C 保存。

说明: 1. 严格按照说明书操作, 每 10⁶ 个细胞大约得到 50-75μg 蛋白。2. 裂解时间是重要的, 过短则细胞裂解不全导致蛋白产率低, 裂解时间长则导致胞浆蛋白有核蛋白污染。3. 只需对提取的胞浆蛋白定量 (Bradford 或 BCA 法), 核蛋白纯度高但含量低, 无需定量, 对于同一个制备, 核蛋白与胞浆蛋白的量于相平行。4. 上述制备的蛋白样品与 2x SDS-PAGE 混合即可上样电泳。5. 切记采用手动玻璃匀浆器, 勿用高速电动匀浆器或超声破碎组织细胞, 避免破坏细胞器结构, 导致分离的组分污染。**玻璃匀浆器须配套选用间隙严紧的研杵, 其特征是将研杵插入匀浆器套管后, 提起研杵而套管不会脱落。正确匀浆是先下压旋转研杵挤破组织, 然后上下缓慢推拉研杵破碎细胞。组织样品制备效果不如细胞样品。**