

细胞核-胞浆-胞膜制备试剂盒

(Nuc-Cyto-Mem Preparation Kit) **P1201**

描述: 本试剂盒能够从哺乳动物新鲜或冻存的组织块、贴壁或悬浮细胞中制备细胞核、细胞膜与胞内质膜、细胞浆等三种主要亚细胞组分。其独特的试剂成分与优化的制备方案使胞核-胞浆-胞膜制备过程简单易行, 无需特殊设备和超速离心, 可在 1 小时内完成。应用本试剂盒制备的胞膜是细胞膜和细胞器膜如线粒体、内质网及质膜的混合物, 得到的细胞核是完整的未裂解细胞核, 胞浆组分为可溶性胞浆蛋白。制备得到的产物纯度可胜任后续的免疫沉淀、蛋白印迹、2-D get、酶活性检测和受体分析等实验。

组成: (以下是 50 次规格用量)

CER (Cytosol Extraction Reagent)	25ml
MER (Membran Extraction Reagent)	2.5ml
NER (NuclearExtractionReagent)	50ml
Suspension Buffer	10ml

储存: 各组分 4 °C 有效期 12 个月

操作步骤:

一. 样本预处理:

收集细胞: (在每一次制备过程中, 使用等量的细胞数将明显提高后续检测结果的一致性, 因此建议在制备前对细胞准确计数)

- 贴壁细胞:** 用 PBS 缓冲液冲洗细胞平皿, 用胰蛋白酶消化细胞。800g 离心 5-10 分钟, 弃上清, 用 PBS 缓冲液重悬洗涤细胞并再次离心收集细胞。
- 悬浮细胞:** 800g 离心 5-10 分钟, 弃上清。用 PBS 缓冲液重悬洗涤细胞并再次离心收集细胞。

以下制备过程要在 4 °C 或冰水浴中进行

二. 组织细胞匀浆裂解

1. 细胞匀浆裂解

向每 1×10^7 个细胞或每 100 μ l (细胞离心后的体积) 细胞沉淀中加入 500 μ l CER 试剂, 震荡重悬, 冰浴 2 分钟。将细胞悬液转移到冰预冷的玻璃匀浆器内, 在冰水浴中上下手动匀浆 20-30 次。

注意: 此破碎细胞步骤为关键环节。要使用 1-3ml 小容积玻璃匀浆器, 须选用间隙严密的研杵, 其特征是将研杵插入匀浆器套管后, 可提起研杵而套管不会脱落。有效研磨是上下推拉而不是旋

转。破碎效果与细胞类型有关, 可在相差显微镜下检查, 未裂解细胞应小于 5%。

2. 组织块匀浆裂解:

取 250mg 哺乳动物新鲜或 -80 °C 冻存组织块放入冰预冷的玻璃匀浆器内, 加入 500 μ l CER 试剂。用研杵捣碎组织块, 上下手动匀浆 20 次, 冰浴 10 分钟, 然后上下手动匀浆 7 次。

注意: 与培养细胞特别是贴壁细胞相比, 组织块中的细胞在匀浆时较易破碎, 因而并非必须选择间隙严密的研杵。如果研杵与套管过于严密, 会使组织匀浆困难, 可选用研杵与套管稍松的匀浆器, 破碎效果与组织细胞类型有关, 可在相差显微镜下检查, 未裂解细胞应少于 5%。

三、粗提物制备:

取约 500 μ l 裂解物, 转移到新的离心管中, 800g, 4°C 离心 5 分钟。此时, 细胞核的粗制品沉淀在管底, 上清为胞膜-胞浆混合物。

四、胞膜胞浆制备:

1) 将步骤三获得的上清转移到新的离心管中, 估计上清的体积; 2) 加入上清液 1/10 体积的 MER 与上清液混合, 冰浴 5 分钟; 3) 14,000rpm, 4°C 离心 30 分钟; 4) 取上清液转移到新离心管中, 此为胞浆组分; 5) 沉淀为胞膜组分, 含有细胞膜和亚细胞器碎片, 可短暂离心除尽液体, 用 50-100 μ l Suspension Buffer 或自备溶液重悬胞膜。

五. 细胞核制备:

1) 向步骤三中获得的细胞核粗提物中加入 500 μ l NER, 震荡重悬; 2) 4,000g, 4°C 离心 5 分钟, 弃上清; 3) 再次加入 500 μ l NER 洗涤细胞核沉淀, 重复上述离心步骤, 离心后的上清应为清亮; 4) 弃上清, 除尽液体。用 50-100 μ l Suspension Buffer 重悬细胞核, 得到完整和没有破碎的细胞核。用户也可以使用自备溶液如 SDS 上样缓冲液直接裂解细胞核。

说明:

- Suspension Buffer 不含去垢剂, 重悬于 Suspension Buffer 中的胞膜或胞核组分呈不溶解状态是正常的, 用户可用自备溶液重悬胞膜或胞核成分。如果进行蛋白印迹、2-D get 等实验, 用户可用 SDS 上样缓冲液直接裂解细胞膜或细胞核成分。对于进行免疫共沉淀实验来说, 可用 RIPA 裂解液 (C1053) 重悬胞膜或胞核组分。
- 胞浆组分可直接进行蛋白定量。纯的胞膜和胞核蛋白浓度很低, 但与胞浆蛋白浓度成比例, 因而不需要单独定量, 如需定量可加入 TritonX-100

至终浓度 1% 或 SDS 至终浓度 0.5% 用 BCA 法蛋白定量。

3. 用 SDS-PAGE Loading 缓冲液裂解细胞核后, DNA 释放会使核裂解物十分粘稠, 可 95°C 加热 5 分钟, 高速震荡打断 DNA, 重复加热 2-3 次。
4. 如果进行凝胶阻滞 (EMSA) 实验, 建议使用普利莱 P1200 产品, 该试剂盒可直接提取可溶性核蛋白。
5. 试剂盒各组分中未添加蛋白酶抑制剂, 用户可自行选择添加, 通常 4°C 快速操作不加蛋白酶抑制剂不会出现问题。
6. 沉淀胞浆蛋白方法: 估算胞浆蛋白组分的体积, 加入 1/3 体积 30% 三氯醋酸水溶液, -20 °C 沉淀 1 小时或过夜。5,000g, 4 °C 离心 10 分钟, 弃上清, 空气略干沉淀。用 1xSDS 上样缓冲液溶解沉淀, 95°C 加热 5 分钟, 上样电泳。

以下仅列举数篇使用普利莱 P1201 试剂盒发表的文章供参考。

- 1、Wu S, Yue Y, Tian H, et al. Tramiprosate protects neurons against ischemic stroke by disrupting the interaction between PSD95 and nNOS[J]. *Neuropharmacology*, 2014, 83: 107-117.
- 2、Xu S, Wang P, Wei K, et al. Cytoprotection of perfluorocarbon on pmvecs in vitro[J]. *Inflammation*, 2013, 36(2): 512-520.
- 3、Yao X, Chen H, Li Y. Protective effect of bicyclol on liver injury induced by hepatic warm ischemia/reperfusion in rats[J]. *Hepatology Research*, 2009, 39(8): 833-842.
- 4、Yan S, Zhou C, Zhang W, et al. β -Catenin/TCF pathway upregulates STAT3 expression in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer letters*, 2008, 271(1): 85-97.
- 5、Shi L L, Yang W N, Chen X L, et al. The protective effects of tanshinone IIA on neurotoxicity induced by β -amyloid protein through calpain and the p35/Cdk5 pathway in primary cortical neurons[J]. *Neurochemistry international*, 2012, 61(2): 227-235.
- 6、Yang X Y, Zhao N, Liu Y Y, et al. Inhibition of NADPH oxidase mediates protective effect of cardiogenic pills against rat heart ischemia/reperfusion injury[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 2013.
- 7、Song X Y, Xu S, Hu J F, et al. Piperine prevents

cholesterol gallstones formation in mice[J]. *European journal of pharmacology*, 2015, 751: 112-117.

- 8、ZHAO H A I P, Feng J, Sun K, et al. Caffeic Acid Inhibits Acute Hyperhomocysteinemia - Induced Leukocyte Rolling and Adhesion in Mouse Cerebral Venules[J]. *Microcirculation*, 2012, 19(3): 233-244.
- 9、Hao H F, Liu L M, Liu Y Y, et al. Inhibitory effect of rhynchophylline on contraction of cerebral arterioles to endothelin 1: Role of rho kinase[J]. *Journal of ethnopharmacology*, 2014, 155(1): 147-153.
- 10、Li A Q, Zhao L, Zhou T F, et al. Exendin-4 promotes endothelial barrier enhancement via PKA-and Epac1-dependent Rac1 activation[J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2015, 308(2): C164-C175.
- 11、Zhao L, Li A Q, Zhou T F, et al. Exendin-4 alleviates angiotensin II-induced senescence in vascular smooth muscle cells by inhibiting Rac1 activation via a cAMP/PKA-dependent pathway[J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2014, 307(12): C1130-C1141.
- 12、Tai W, Ye X, Bao X, et al. Inhibition of Src tyrosine kinase activity by squamosamide derivative FLZ attenuates neuroinflammation in both in vivo and in vitro Parkinson's disease models[J]. *Neuropharmacology*, 2013, 75: 201-212.
- 13、Wang Q, Lin Y, Zhang W, et al. Lead induces dysregulation of iron regulatory protein 1 via the extracellular signal-regulated kinase pathway in human vascular endothelial cells[J]. *Brain research*, 2012, 1455: 19-27.
- 14、Miao Y, Dong L D, Chen J, et al. Involvement of calpain/p35-p25/Cdk5/NMDAR signaling pathway in glutamate-induced neurotoxicity in cultured rat retinal neurons[J]. *PloS one*, 2012, 7(8): e42318.
- 15、Liu X D, Yang J J, Fang D, et al. Functional Upregulation of Nav1. 8 Sodium Channels on the Membrane of Dorsal Root Ganglia Neurons Contributes to the Development of Cancer-Induced Bone Pain[J]. *PloS one*, 2014, 9(12): e114623.
- 16、Liu M, Yang H, Fang D, et al. Upregulation of P2X3 receptors by neuronal calcium sensor protein VILIP-1 in dorsal root ganglions contributes to the bone cancer pain in rats[J]. *Pain*, 2013, 154(9): 1551-1568.