

细胞核蛋白/浆蛋白抽提试剂盒

Nuclear and Cytoplasmic Protein Extraction Kit

使用说明书

货号及规格:

目录编号	包装规格
P315-01	50T

试剂盒组成及储存:

试剂盒组成	保存	P315-01
Cytoplasmic Extraction Reagent A(CER A)	4°C	10 mL
Cytoplasmic Extraction Reagent B(CER B)	4°C	0.55 mL
Nuclear Extraction Reagent (NER)	4°C	2.5 mL

产品储存: 常温运输, 4°C保存, 12 个月内有效。

产品简介: 细胞核蛋白/浆蛋白抽提试剂盒(Nuclear and Cytoplasmic Protein Extraction Kit)提供了一种简单、方便的从培养细胞或新鲜组织中抽提核蛋白与浆蛋白的方法。约90分钟就可以完成培养细胞的核蛋白与浆蛋白的分离。抽提得到的蛋白为非变性, 有活性, 可以用于Western、EMSA、Footprinting、报告基因检测以及酶活力测定等后续实验操作。本试剂盒是通过细胞浆蛋白抽提试剂A和B, 在低渗透压条件下, 使细胞充分膨胀后破坏细胞膜, 释放出浆蛋白, 然后通过离心得到细胞核沉淀。最后通过高盐的细胞核蛋白抽提试剂抽提得到核蛋白。本试剂盒可以抽提50个, 数量为 2×10^6 个Hela细胞(约40mg)的样品。可根据需要按比例放大, 缩小提取规模。

产品特点:

- 理想的再生液应该是洗脱一抗二抗的同时, 不洗脱膜上结合的蛋白(抗原), 或者改变抗原的结合性质, 但是目前没有一种再生液可以做到只洗脱一抗二抗, 而完全不洗脱膜上结合的抗原。也没有一种再生液可以适用于所有不同亲和度的抗原抗体复合物, 太强, 则抗原也容易被洗脱; 太弱, 则一抗二抗残留太高。本试剂盒配备了两种适用不同亲和力抗原抗体复合物的配方(Strong Buffer 和 Mild Buffer), 用户可以根据自己抗原抗体结合强度选用。
- 传统分子克隆上介绍的方法对抗原洗脱强度过大, 常常会导致蛋白信号的减弱。但是, 本再生液为本公司独有的配方, 效力强, 但是对蛋白作用温和, 经过多个抗体的检测试验, 通常可以重复利用膜 5 次或者更多。
- 不含有常用的 β -巯基乙醇, 没有异味, 操作简单快速, 室温进行, 最快 15-20 钟就可以完成全过程。

操作步骤(实验前请先阅读注意事项):

⇒ **准备溶液:** 室温融解试剂盒中的三种试剂, 溶解后立即放置在冰上, 混匀。取适量的 CER A 备用, 在需要加入前数分钟内加入 PMSF 至终浓度为 1mM。取适量的 NER 备用, 在需要加入前数分钟内加入 PMSF 至终浓度为 1mM。如果目标蛋白含丰富的半胱氨酸, 可在 CER A、NER 中加入 DTT 至终浓度 0.5mM。

- 对于贴壁细胞:** 用 PBS 洗一遍, 用细胞刮子刮下细胞, 或用 EDTA 溶液处理细胞使细胞不再贴壁很紧, 并用移液器吹打细胞(最好不用胰酶消化, 因为可能降解蛋白)。500xg 离心 2-3 分钟, 尽可能吸弃上清, 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。接步骤 4。
- 对于悬浮细胞:** 用 PBS 洗一遍, 500xg 离心 2-3 分钟, 尽可能吸弃上清, 留下细胞沉淀备用。接步骤 4。
- 对于新鲜组织:**
 - 把组织尽可能切成非常细小的碎片。在 PBS 里面匀浆制成细胞悬液, 500xg 离心 2-3 分钟, 弃上清, 估计细胞沉淀体积, 接步骤 4。
 - 把组织称重后, 把组织尽可能切成非常细小的碎片, 按照每 50 毫克组织加入 500 微升的比例加入 CER A, 匀浆后把匀浆液转移到塑料离心管内, 接步骤 5。在步骤 7 按照每 200 微升 CER A 加 11 微升比例加入 CER B。
- 每 20 微升细胞沉淀加入 200 微升添加了 PMSF 的 CER A。(对于 2×10^6 个 Hela 细胞, 其细胞沉淀的体积大约为 20 微升或 40 毫克。)
- 最高速剧烈 Vortex 15 秒, 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 Vortex

时间。)

6. 冰浴 10-15 分钟。
7. 加入 CER B 11 微升。最高速剧烈 Vortex 5 秒，冰浴 1 分钟。
8. 最高速剧烈 Vortex 5 秒，4°C 14,000-16,000g 离心 5 分钟。
9. 立即吸取上清至一预冷的离心管中，即为抽提得到的细胞浆蛋白。可以立即使用，也可以冻存。(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。)
10. 对于沉淀，完全吸尽残余的上清，加入 50 微升添加了 PMSF 的 NER。(不吸尽上清会污染有细胞浆蛋白。)
11. 最高速剧烈 Vortex 15-30 秒，把细胞沉淀完全悬浮并分散开。然后放回冰浴中，每隔 10 分钟再高速剧烈 Vortex 15—30 秒，共 40 分钟。
12. 4°C 14,000—16,000xg 离心 10 分钟。
13. 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-70°C冻存。

注意事项：

1. 需自备PMSF， **PMSF一定要在抽提试剂加入到样品前2-3分钟内加入，以免PMSF在水溶液中很快失效。**
2. 抽提蛋白的所有步骤都需在冰上或4°C进行。
3. 对于组织样品， **本试剂盒仅适合于新鲜组织，对冻存过的组织抽提效果差。**可以抽提的组织样品数通常不足50个。
4. 使用本试剂盒抽提得到的细胞核蛋白与细胞浆蛋白都可以直接用爱普科学生产的BCA蛋白定量试剂盒(P301)测定蛋白浓度。但不适合用Bradford法测定蛋白浓度。
5. 为了您的健康和安​​全，请穿实验服并戴一次性手套操作。
6. 本产品仅供科研用途使用，不得用于临床和诊断。

问题与解决方法：

问题	评论与建议
胞浆蛋白产量低	<ul style="list-style-type: none"> ■细胞没有裂解完全-建议：增加 CER B 用量比例 ■细胞团分散不完全-建议： Vortex 剧烈完全
胞核蛋白产量低	<ul style="list-style-type: none"> ■细胞团分散不完全-建议： Vortex 剧烈完全 ■不完全细胞核分离-建议： 加入 CER B 后，加大离心时间
蛋白浓度低	<ul style="list-style-type: none"> ■抽提试剂和细胞团的体积比例不适宜-建议： 按照 20 微升细胞团（约 40mg）比例加 200 微升 CER A
蛋白活性低 或者没有活性	<ul style="list-style-type: none"> ■样品没有保持低温操作-建议： 始终低温离心和保持样品在冰上 ■蛋白酶活性偏高-建议： 除了 PMSF，可加入多种 protease inhibitor 联合抑制蛋白酶活性
胞核蛋白和胞浆蛋白 有严重的相互混合	<ul style="list-style-type: none"> ■细胞浆抽提物(胞浆蛋白)未完全清除-建议： 细胞核抽提前，仔细吸去所有的胞浆抽提上清 ■细胞裂解不完全-建议： 加大 Vortex 时间和冰浴时间 ■细胞裂解过度-建议： 减少 Vortex 时间和冰浴时间 ■匀浆过度，不足或者不均匀-建议： 优化匀浆时间和条件
胞浆/胞核蛋白产量 同时低或者没有	<ul style="list-style-type: none"> ■可能和细胞种类有关-建议： 该种细胞系可能不适合本方法
裂解过程中发现变得 十分粘稠或者显微镜 下发现胞核裂解	<ul style="list-style-type: none"> ■裂解过度，胞核也完全裂解，DNA 释放出来了。-建议： 减少 CER B 用量比例或者不加；减少 Vortex 时间和冰浴时间。

