

细胞核蛋白和胞浆蛋白制备试剂盒

KP309 50次

试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	KP309
胞浆蛋白 buffer A	4°C	25 ml
胞浆蛋白 buffer B	4°C	1.5 ml
胞核蛋白 buffer C	4°C	5 ml

本试剂盒在所需温度储存 12 个月不影响使用效果。

产品介绍:

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(EMSA)、免疫共沉淀、酶活性测定, 也适于 Western Blot 实验。

操作步骤:

1. 操作应在冰浴中进行, 试剂需提前预冷。
2. 裂解样品 2.1 裂解: 培养细胞
 - a. PBS 洗涤细胞 2 次, 根据细胞计数, 或者估计离心后的细胞体积 PCV。
 - b. 每 1×10^6 个细胞加入 50~100ul 的 buffer A。
 - c. 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 buffer A (即 10~20 ul PCV 的细胞加 50~100ul 的 buffer A), 剧烈振荡重悬。
- 2.2 裂解: 组织样本
 - a. 精确称重后剪成小块, PBS 洗涤 2 次。

- b. 通常 10 mg 动物组织相当于 1×10^6 个细胞, 需加入 50~100ul buffer A, 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。
3. 裂解后产物转移至预冷的 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。
4. 可选步骤: 根据步骤 3 裂解物体积, 加入 1/20 体积的 buffer B, 振荡 10 秒, 冰浴 1min (加入 buffer 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。
5. 胞浆蛋白组分的制备: 将步骤 3 或步骤 4 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。
6. 胞核粗提组分的制备: 取第步骤 5 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 buffer A 和 5μl buffer B, 振荡 10 秒, 重悬沉淀, 冰浴 1min, 1000g 离心 5min, 弃上清。再次加入 100μl buffer A 和 5μl buffer B 重悬沉淀冰浴 1min, 1000g 离心 5min, 尽弃上清, 保留沉淀。
7. 胞核蛋白的制备: 加 50~100μl 预冷 buffer C 重悬步骤 6 的离心沉淀, 剧烈振荡 15 秒, 冰上 30min, 期间每 10 min 振荡 15 秒。12000g 离心 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 10^6 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
4. 上述制备的蛋白样品与 2x SDS-PAGE 混合即可上样电泳。
5. 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。