

细胞核-胞浆-胞膜制备试剂盒

KP310 50次

试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	KP310
胞液蛋白 buffer A	4°C	25 ml
胞膜蛋白 buffer B	4°C	2.5 ml
胞核蛋白 buffer C	4°C	50 ml
悬浮液 buffer D	4°C	10 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:

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-Dget、酶活性检测和受体分析等实验。

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)

1. 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。
2. 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。

二. 组织细胞匀浆裂解 (以下制备过程要在冰浴或者 4°C进行)

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 buffer A 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 buffer A 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: (以下制备过程要在冰浴或者 4°C进行)

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: (以下制备过程要在冰浴或者 4°C进行)

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 buffer B 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 Buffer D 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 Buffer C, 震荡重悬。

2. 4,000g, 4°C离心 5 分钟, 弃上清。
3. 再次加入 500µl Buffer C 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 50-100µl Buffer D 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。
5. 说明: 1. Buffer D 不含去垢剂, 重悬于 Buffer D 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 裂解液重悬胞膜或胞核组分。 2. 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 KP309 产品, 该试剂盒可直接提取可溶性核蛋白。
6. 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。
7. 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, 空气凉干沉淀。用 1xSDS 上样缓冲液溶解沉淀, 95°C 加热 5 分钟, 上样电泳。