

细胞核蛋白 / 浆蛋白提取试剂盒(多应用型)

Nuclear and Cytoplasmic Protein Extraction Kit (Multi-application Type)

本产品需冰袋运输；置于 4°C 保存, 保质期 12 个月。

货号规格

货号	规格
PC203	50次(细胞)

产品内容

组分名称	体积(50次)
核/浆试剂A	20 mL
核/浆试剂B	0.5 mL
核/浆试剂C	5 mL

产品简介

本产品可以从动物细胞或组织中方便高效地分离细胞核蛋白和细胞浆蛋白,其可逐步裂解细胞,将完整的细胞核从细胞质中分离出来,然后从细胞核中提取出细胞核蛋白。

本产品不含去污剂,能够有效提取细胞核内的可溶性蛋白,但不包括核膜蛋白。脱盐或稀释后,分离的蛋白可用于 WB、IP、EMSA、Footprinting、报告基因检测及酶活力测定等实验。

产品特点

- 得率佳** — 本产品可有效提取细胞核内可溶性蛋白(不包括核膜蛋白);
- 纯度高** — 核蛋白 / 浆蛋白分离效果显著,交叉污染率极低(效果优于传统试剂盒);
- 易操作** — 操作简单,无需梯度超速离心;
- 高兼容** — 本产品提取产物适用于 WB、IP、EMSA、Footprinting、报告基因检测和酶活力测定等实验。

注意事项

1. 本产品仅适用于动物细胞或组织,不可用于植物,酵母,大肠杆菌等样品胞核 / 胞浆蛋白的提取;
2. **试剂 A** 和 **试剂 C** 使用时请加入 1× 蛋白酶抑制剂(货号:GRF101)或 1× 蛋白酶和磷酸酶抑制剂(货号:GRF103);
3. 本产品为多应用型试剂盒,提取的细胞核蛋白中不包括核膜蛋白,适用于 WB、IP、EMSA、Footprinting、报告基因检测及酶活力测定等实验,但 WB 实验效果不如货号 **PC204**,若进行 WB 实验建议使用货号 **PC204**;
4. 提取的蛋白样品可使用 BCA 蛋白定量试剂盒(货号:ZJ102)进行蛋白定量;
5. 为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作;
6. 本产品仅限科研使用。



将融化后的试剂 B 和试剂 C 置于冰上,使用前请添加 1× 蛋白酶抑制剂(货号:GRF101)或 1× 蛋白酶和磷酸酶抑制剂(货号:GRF103)

动物细胞

1. 贴壁细胞: 弃去培养皿中的培养基,加入适量 PBS 缓冲液(货号:CB012),用细胞刮刀将细胞从培养皿表面刮下,将细胞重悬转移至离心管中。300×g 离心 5 min,吸弃上清;
悬浮细胞: 将细胞转移至离心管中,300×g 离心 5 min,吸弃上清;再加入适量 PBS 缓冲液重悬细胞,300×g 离心 5 min,吸弃上清。
注意: 不能用胰酶处理贴壁细胞。胰酶会使细胞变得很脆弱,影响后续核质分离。
2. 用适量 PBS 重悬细胞,取 2×10⁶ 个细胞置于 1.5 mL 离心管中,300×g 离心 5 min,吸弃上清。按照表 1 所推荐的试剂体积进行细胞浆和细胞核蛋白提取,2×10⁶ 个细胞体积通常为 20 μL,以下步骤都是以 20 μL 的细胞体积为例进行操作;
注意: 不可仅凭经验收取细胞,一定要用细胞计数仪检测细胞活率和密度,再取 2×10⁶ 个细胞。

表 1. 不同细胞体积推荐的提取试剂体积

细胞体积/μL	核/浆试剂A/μL	核/浆试剂B/μL	核/浆试剂C/μL
10	100	5	50
20	200	10	100
50	500	25	250
100	1000	50	500

3. 向细胞沉淀中加入 200 μL 试剂 A,充分混匀后,冰上静置 10 min;
4. 向上步所得细胞悬液中再加入 10 μL 试剂 B,最高速涡旋振荡 5 sec,冰上静置 1 min;
5. 再进行最高速涡旋振荡 5 sec,冰上静置 2 min;
注意: 对于不同种类的细胞,此步骤的冰浴时间可适当延长(3 min)或缩短(1 min),避免出现沉淀聚集现象即可。
6. 将孵育后的细胞离心 10 min (1,600×g,4°C),小心吸去含有胞浆蛋白的上清液,如有需要可转移至新离心管中,置于冰上或分装后储存于 -80°C 备用;
注意: 吸头切勿触及细胞沉淀,为降低胞浆组分对细胞核组分的污染,可以在沉淀上方保留极小体积的上清,换用 10 μL 吸头尽可能吸尽上清。
7. 加入 200 μL 试剂 A 重悬细胞沉淀,充分混匀后,立即离心 5 min (13,000×g,4°C),弃尽上清;
注意: 沉淀含有细胞核,可以在沉淀上方保留极小体积的上清,换用 10 μL 吸头吸尽上清。
8. 向沉淀中加入 100 μL 试剂 C,充分混匀后,最高速涡旋振荡 15 sec,置于冰上,在 40 min 内每隔 10 min 重复涡旋一次;
9. 将上步孵育后的悬液离心 10 min (13,000×g,4°C),将含有可溶性细胞核蛋白的上清液转移至新离心管中置于冰上或分装后储存于 -80°C 备用。

动物组织

1. 把 20~80 mg 动物组织尽可能剪成小的碎片置于 2 mL 离心管中(可在组织中加入适量 PBS 缓冲液,使用注射器的活塞柄将其研碎),离心 3 min (1,600×g,4°C)收集碎片沉淀;
注意: 必须使用新鲜的组织样品提取核核 / 胞浆蛋白。冻存的组织细胞会受损,导致核质分离效果变差;如果是刚刚取下的组织,不能立刻做实验,可以将组织于无菌环境下放入细胞培养基(如 DMEM)中 4°C 暂时保存,并于 48 h 内完成实验(需确保培养基未污染)。
2. 向组织碎片中加入 试剂 A,转移至 1~2 mL 玻璃匀浆器中,在冰上进行充分匀浆。按照表 2 所推荐的试剂体积进行细胞浆和细胞核蛋白提取;
**注意: ① 须使用玻璃匀浆器研磨组织,不可使用破碎机破碎组织;
② 为充分转移组织小块,可用剪刀剪短移液器吸头末端,便于使用移液器吸起组织小块。**

表 2. 不同组织量推荐的提取试剂体积

组织重量/mg	核/浆试剂A/ μ L	核/浆试剂B/ μ L	核/浆试剂C/ μ L
20	200	10	100
40	400	20	200
60	600	60	600
80	800	80	800

3. 把匀浆液转移至干净预冷的离心管中,冰上孵育 15 min;
4. 将 **试剂 B** 加入匀浆液中,最高速涡旋振荡 5 sec,冰上静置 1 min;
5. 再进行最高速涡旋振荡 5 sec,冰上静置 2 min;
6. 将孵育后的匀浆液离心 10 min ($1,600\times g, 4^{\circ}\text{C}$),小心吸去含有**胞浆蛋白**的上清液,如有需要可转移至新离心管中,置于冰上或分装后储存于 -80°C 备用;
注意: 吸头切勿触及细胞沉淀,为降低胞浆组分对细胞核组分的污染,可以在沉淀上方保留极小体积的上清,换用 $10\ \mu\text{L}$ 吸头尽可能吸尽上清。
7. 加入与步骤 2 等体积的 **试剂 A** 重悬细胞沉淀,充分混匀后,立即离心 5 min ($13,000\times g, 4^{\circ}\text{C}$),弃尽上清;
注意: 沉淀含有细胞核,可以在沉淀上方保留极小体积的上清,换用 $10\ \mu\text{L}$ 吸头吸尽上清。
8. 向沉淀中加入 **试剂 C**,充分混匀后,最高速涡旋振荡 15 sec,置于冰上,在 40 min 内每隔 10 min 重复涡旋一次;
9. 将上步孵育后的悬液离心 10 min ($13,000\times g, 4^{\circ}\text{C}$),将含有可溶性细胞核蛋白的上清液转移至新离心管中置于冰上或分装后储存于 -80°C 备用。