

## 核蛋白提取试剂盒说明书

货号: R30504

规格: 50T/100T

有效期: 1年

产品内容:

| 试剂盒组成        | 50T   | 100T |
|--------------|-------|------|
| 浆蛋白抽提试剂      | 25ml  | 50ml |
| 核蛋白抽提试剂      | 5ml   | 10ml |
| PMSF (100mM) | 300μl | 1ml  |

保存: 核/浆蛋白抽提试剂 4℃ 保存, PMSF于-20℃ 保存。

产品简介:

本试剂盒提供了一种简单、方便的从培养细胞或新鲜组织中抽提核蛋白的方法。整个过程只需约 60分钟就可以将核蛋白和浆蛋白从细胞中分离出来。得到的蛋白可以用于 Western blot等实验。本试剂盒通过浆蛋白抽提试剂使细胞膨胀破裂, 释放出胞浆蛋白, 再通过离心得到细胞核。然后通过核蛋白抽提试剂抽提得到细胞核蛋白。本试剂盒可以抽提 50/100个样品 (每个样品约  $2 \times 10^6$  个 Hela细胞或 40mg组织)。

操作方法:

裂解蛋白的所有步骤都需在冰上或 4℃ 进行。

一、对于体外培养细胞:

1. 根据用量取适当的浆蛋白抽提试剂和核蛋白抽提试剂加入 PMSF, 使 PMSF的最终浓度为 1mM。PMSF需现用现加, 若目标蛋白含有丰富的半胱氨酸, 可以在两种蛋白抽提液中加入DTT至终浓度 0.5mM。
2. 对于贴壁细胞, 去除培养液, 用PBS洗一遍, 用细胞刮刀收集细胞, 或用 EDTA消化后吹打下细胞 (最好不用胰酶消化, 以免胰酶消化目的蛋白)。500 g离心 2~3分钟收集细胞, 吸尽上清留下沉淀备用。
3. 对于悬浮细胞: 用PBS洗一遍500 g离心2~3分钟收集细胞, 吸尽上清, 留下细胞沉淀备用。
4. 每 20μl细胞沉淀加入200μl浆蛋白抽提试剂 ( $2 \times 10^6$  个细胞沉淀的体积约20μl或40mg)。
5. 用移液器吹打或高速涡旋 15秒 (可适当延长), 必须使细胞沉淀完全分散开成单细胞悬液。细胞沉淀分散不完全会导致蛋白产量降低。
6. 冰浴 10分钟。
7. 最高转速剧烈涡旋 10秒, 4℃ 12000~16000g离心10分钟。
8. 上清即为抽提得到的细胞浆蛋白, 立即吸取上清至预冷的样品管中备用, 进行后续的PAGE、Western等实验, 但蛋白浓度较低, 可根据需要进行相应浓缩。
9. 沉淀即为细胞核, 要完全吸尽残余的上清 (避免细胞浆蛋白的污染), 加入 50-100μl核蛋白抽提试剂。

10. 用移液器吹打或高速涡旋 15秒（可适当延长）至沉淀完全分散，冰浴 10分钟。
11. 最高转速剧烈涡旋 10秒，4℃12000~16000g离心 10分钟。
12. 立即吸取上清至预冷的样品管中，此即为抽提得到的细胞核蛋白。可进行后续实验或-70℃冻存。

对于组织样品：

把组织称重后，尽可能切成非常细小的碎片，按每 50mg组织加入 200μl-500μl PBS，用匀浆器冰上匀浆制成细胞悬液，500 g离心 2~3分钟收集细胞，吸尽上清，收集沉淀。加入 200μl浆蛋白抽提试剂后接上述步骤 5。

注意事项：

1. 裂解得到的蛋白样品，由于含有较高浓度的去垢剂干扰，不能用 Bradford法测定蛋白浓度，可以选用本公司生产的 BCA蛋白定量试剂盒(货号 PC0020)测定蛋白浓度。
2. 对于组织样品，本试剂盒适用于新鲜组织，对冻存组织抽提效果较差。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。