

亚细胞结构蛋白提取试剂盒

产品货号: 26516

产品规格: 50 assays

产品介绍:

本试剂盒是专门针对从各种动物细胞中快速高效地抽提分离不同亚细胞蛋白质组份而设计的。运用含有不同去污剂的抽提试剂对动物细胞按照亚细胞结构进行有序的抽提, 可将细胞内的蛋白依次分离成四部分分别是: 胞浆蛋白、细胞膜和细胞器膜蛋白、核蛋白、细胞骨架(微丝和中等纤维)蛋白和核基质蛋白。除了细胞骨架蛋白和核基质蛋白不能够用于EMSA, 酶活测定等需要蛋白活性相关研究外, 分离得到的其他各蛋白组分可直接用于1D/2D电泳、Western Blot分析、酶活测定和蛋白定位研究等。

产品组成:

产品名称	规格	保存条件
Extraction Buffer 1	25mL	2-8°C
Extraction Buffer 2	25mL	2-8°C
Extraction Buffer 3	13mL	2-8°C
Extraction Buffer 4	13mL	2-8°C
Protease Inhibitor	1mL	-20°C
Extraction Reagent	3.8mg	-20°C, 避光
Wash Buffer	100mL	2-8°C

产品特点:

1. 提取的蛋白绝大多数保持原有活性和完整性;
2. 操作简便、蛋白产量高、无需超高速离心;
3. 每次可以从 5×10^6 悬浮或贴壁培养的细胞中提取几乎所有蛋白质;
4. 根据不同蛋白质在不同去污试剂中的溶解能力的不同, 将细胞中不同部分的蛋白质有顺序地依次提取, 可以提高蛋白质的提取效率和蛋白质的浓度;
5. 整个实验过程大概需要两个小时左右。

操作步骤:

1. 实验前, 将Extraction Reagent溶解于250 μ L双蒸水中, 溶解后置于-20°C保存待用。
2. 对于悬浮生长的细胞: 用预冷的Wash Buffer洗细胞两次, 3000rpm (800g) 离心5min收集细胞, 称量细胞湿重并记录。
对于贴壁生长的细胞: 用预冷的Wash Buffer洗细胞两次, 用细胞刮刮除细胞后重悬, 将细胞悬液转移到2mL无菌洁净的离心管中, 低速离心后去除上清再用Wash Buffer洗涤一次。
3. 胞浆蛋白抽提:
 - 1) 对于悬浮生长的细胞: 以每100mg湿重细胞为例, 需要向其中加入500 μ L预冷的Extraction Buffer 1、5 μ L溶解后的Extraction Reagent溶液和5 μ L的Protease Inhibitor, 轻轻将细胞颠倒重悬;
对于贴壁生长的细胞: 按每个T25培养瓶(约 $1 \sim 5 \times 10^6$ 个细胞)加入1mL预冷的Extraction Buffer 1和10 μ L的Protease Inhibitor(无需加入Extraction Reagent溶液);
 - 2) 将预冷并处理好的细胞悬液放置在脱色摇床上中速振荡5~10min, 直到95~100%的细胞被裂解, 可以用台盼蓝检查细胞的破碎情况;
 - 3) 转置冷冻离心机, 于4°C, 3000rpm (800g) 离心5~10min, 小心地吸取上清, 分装并超低温保存于-70°C, 即为胞浆蛋白和可溶性细胞骨架蛋白抽提液, 保留沉淀进行下一步提取。
4. 细胞膜和细胞器膜蛋白抽提:
 - 1) 向步骤3-3中获得的沉淀中加入:
对于悬浮生长的细胞: 按照每100mg湿重细胞沉淀中加入500 μ L预冷的Extraction Buffer 2和5 μ L的Protease Inhibitor轻轻将沉淀重悬;
对于贴壁生长的细胞: 按每个T25培养瓶(约 $1 \sim 5 \times 10^6$ 个细胞)加入1mL预冷的Extraction Buffer 2和10 μ L的Protease



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

Inhibitor, 轻轻将沉淀重悬;

- 2) 将预冷并处理好的细胞放置在脱色摇床上中速振荡30min左右。
- 3) 转置冷冻离心机, 于4°C, 7500rpm (5000g) 离心5~10min, 小心地吸取上清, 分装并超低温保存于-70°C, 即为细胞膜/细胞器膜蛋白抽提液, 保留沉淀进行下一步提取。

5. 核蛋白抽提:

- 1) 向步骤4-3中获得的沉淀中加入:

对于悬浮生长的细胞: 向每100mg湿重细胞沉淀中加入250 μ l预冷的Extraction Buffer 3和2.5 μ l的Protease Inhibitor并将沉淀重悬, 并用玻璃匀浆器进行中速匀浆5次(力度不要过大, 轻轻用玻璃杵匀速研磨)或脱色摇床上中速振荡30min左右;

对于贴壁生长的细胞: 按每个T25培养瓶(约 1×10^7 个细胞)加入0.5mL的预冷的Extraction Buffer 3和5 μ l的Protease Inhibitor, 将冰浴细胞放置在脱色摇床上中速振荡30min左右(贴壁细胞不建议用玻璃匀浆器匀浆);

- 2) 转置冷冻离心机, 于4°C, 9000rpm (6780g) 离心10min, 小心地吸取上清, 分装并超低温保存于-70°C, 即为核蛋白抽提液, 保留沉淀进行下一步提取。

6. 细胞骨架蛋白抽提:

向步骤5-2中获得的沉淀中加入:

- 1) 对于悬浮生长的细胞: 按照每1mg湿重细胞沉淀中加入5 μ l预冷的Wash Buffer和0.5 μ l的Protease Inhibitor并将沉淀重悬, 用玻璃匀浆器进行高速匀浆(加大力度, 充分裂解细胞释放蛋白)。将匀浆液转置冷冻离心机, 于4°C, 12000rpm (11600g) 离心15min, 弃上清, 沉淀用-20°C预冷的90%丙酮清洗一次, 冻干后超低温保存于-70°C, 即为细胞骨架蛋白抽提物。
- 2) 对于贴壁生长的细胞: 按每个T25培养瓶(约 1×10^7 个细胞)加入1mL预冷Wash Buffer和10 μ l的Protease Inhibitor洗涤, 弃上清并用0.5mL的Extraction Buffer 4溶解, 用小口径枪头反复吹吸, 直到不再很粘稠, 超低温保存于-70°C, 即为细胞骨架蛋白抽提物。

注意事项:

1. 用双蒸水配置的Extraction Reagent置于-20°C保存, 保存时间不要超过三个月, 可以按照比例称取少量粉末, 配置少量水溶液。
2. 使用前先将所有的Extraction Buffer振荡混匀, 再将Protease Inhibitor缓慢地加入到各Extraction Buffer中, 边加边混匀待用。
3. 验过程中注意无菌操作, 防止样品和试剂污染, 同时所用仪器和抽提液需要预冷并在低温下操作, 以保持蛋白活性和提高蛋白产量。
4. 步骤中的细胞含量仅作为加样参考值, 具体可根据实际细胞量及不同细胞裂解程度不同进行换算添加。
5. Extraction Buffer 4溶解的样品和Extraction Buffer 3(含有较高的盐份)提取的样品, 如果用于2D电泳, 请用-20°C预冷的TCA/丙酮清洗2~3次, 每次涡旋振荡30sec, 冰上或4°C静置15~30min, 转置4°C, 15000rpm (20000g), 离心15min取沉淀, 再用预冷的乙醚:乙醇(1:1 V/V)或丙酮洗涤沉淀2~3次, 每次涡旋振荡30sec, 冰上或4°C静置10~15min, 转置冷冻离心机, 于4°C, 15000rpm (20000g) 离心15min, 一旦离心结束, 尽快将EP管从离心机上取出, 用枪头尽可能去除上清并保留沉淀。冷冻沉淀干燥后再用较强的2D电泳样品缓冲液(含有两性电解质)溶解。其它的提取液可以直接用2D电泳样品缓冲液(含有两性电解质)溶解。
6. 由于在细胞抽提物中含有去污剂和变性试剂, 请采用我公司的非干扰型蛋白质浓度定量试剂盒或改良型Lowry法蛋白质浓度定量试剂盒对提取样品中的蛋白质进行定量。对于一般的染色, 可以采用无毒型考马氏亮蓝染色液或高灵敏考马氏亮蓝染色液或通用型蛋白染色液进行染色。
7. 在步骤3和步骤4中, 悬浮沉淀和混匀时, 不要剧烈振荡, 避免造成细胞器或细胞核破裂, 影响后续的蛋白抽提和各部分成分的混杂。
8. 产品中的保存条件及有效期均以未开封情况下计算, 为了防止产品与空气接触发生化学反应影响产品性能, 将未使用完毕的组分按存储要求保存同时建议开封后的组分尽快使用完毕。
9. 使用后请旋紧瓶盖, 防止溶液挥发和与空气中的物质发生化学反应。
10. 本试剂盒只能用于体外实验, 不能够用于临床、治疗和动物体内实验等, 由此产生的后果概不承担责任。

有效期: 24个月有效。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com