

细胞核-胞浆蛋白-胞膜制备试剂盒

产品货号：26404

产品规格：50次/100次

描述：

本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-D get、酶活性检测和受体分析等实验。

试剂盒组成：

组分	50次	100次	保存条件
CER (Cytosol Extraction Reagent)	25ml	50ml	2-8°C
MER (Membran Extraction Reagent)	2.5ml	5ml	2-8°C
NER (NuclearExtractionReagent)	50ml	100ml	2-8°C
Suspension Buffer	10ml	20ml	2-8°C

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。

以下制备过程要在4°C或冰水浴中进行

二. 组织细胞匀浆裂解

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 CER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 CER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：



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

取约500 μ l裂解物，转移到新的离心管中，800g，4 $^{\circ}$ 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：

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MER与上清液混合，冰浴5分钟；3) 14,000rpm，4 $^{\circ}$ 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 Suspension Buffer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 NER，震荡重悬；2) 4,000g, 4 $^{\circ}$ C离心5分钟，弃上清；3) 再次加入500 μ l NER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50-100 μ l Suspension Buffer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。

说明：

1. Suspension Buffer不含去垢剂，重悬于Suspension Buffer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 $^{\circ}$ C加热5分钟，高速震荡打断DNA，重复加热2-3次。
4. 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 $^{\circ}$ C快速操作不加蛋白酶抑制剂不会出现问题。
5. 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 $^{\circ}$ C沉淀1小时或过夜。5,000g, 4 $^{\circ}$ C离心10分钟，弃上清，空气略干沉淀。用1 \times SDS上样缓冲液溶解沉淀，95 $^{\circ}$ C加热5分钟，上样电泳。

有效期：12个月。



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