

Nc-细胞核/浆蛋白抽提试剂盒

项目号: N666081

储存条件: -20℃。

产品内容

组分	50T
Nc-Buffer A	50ml
Nc-Buffer B	3ml
Nc-Buffer C	25ml
Protease Inhibitor Cocktail	750 μ l

产品简介

Nc-细胞核/浆蛋白抽提试剂盒能够简单、快速的提取来源于哺乳动物细胞及组织的细胞核和细胞浆蛋白，所提取蛋白保持生物学活性。本试剂盒首先通过细胞浆蛋白抽提试剂裂解细胞膜，释放细胞浆蛋白，然后通过离心得到细胞核沉淀。最后通过细胞核蛋白抽提试剂抽提得到细胞核蛋白。抽提获得的核蛋白及浆蛋白纯度高，有效避免核/浆蛋白的交叉污染，可以用于 Western、Gel Shift、报告基因检测以及酶活力测定等后续操作。

注意事项

1. 如需提取磷酸化蛋白请在抽提试剂中加入磷酸酶抑制剂。
2. 所有样品操作请置于冰上进行。
3. 可根据具体实验情况调整试剂用量，保证各试剂使用比例为 Nc-Buffer A:Nc-Buffer B:Nc-Buffer C=100:5.5:50。
4. 可以采用更高的速度来离心。

操作步骤

I 细胞中胞浆、胞核蛋白的提取

1. 请在蛋白抽提前取出抽提试剂 Nc-Buffer A 和 Nc-Buffer C 进行预冷
2. 收集细胞，计数。离心去上清。
3. 1×10^7 细胞中加入 1ml Nc-Buffer A (按照 1:99 比例在蛋白抽提前 2-3 分钟内加入 Protease Inhibitor Cocktail)，涡旋 5 秒以充分混匀，冰上孵育 20 分钟。
注意：各种细胞的特性不同，需要根据不同细胞的特性调整 Nc-Buffer A 的用量，如果蛋白浓度小，按比例减少 Nc-Buffer A 及后续 Nc-Buffer B、Nc-Buffer C 的用量。
4. 加入 55 μ l Nc-Buffer B，涡旋 5 秒以充分混匀，冰上孵育 1 分钟。
5. 4℃ 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 15 分钟，收集上清 (尽量收集干净上清液) 至新的离心管中，-20℃ 保存 (此提取液为胞浆蛋白)。
6. 向上步所得的沉淀中加入 500 μ l Nc-Buffer C (使用前按照 1:99 比例加入 Protease Inhibitor Cocktail)，涡旋 5 秒以充分混匀，重悬沉淀，冰上孵育 40 分钟，每隔 10 分钟涡旋混匀一次，每次约 15-30 秒。

7. 4℃ 12,000 rpm 离心 15 分钟，收集上清（尽量收集干净上清液）至新的离心管中，-20℃ 保存（此提取液为胞核蛋白）。

II 组织中胞浆、胞核蛋白的提取

1. 取材，保存组织。

2. 在蛋白抽提前取出抽提试剂 Nc-Buffer A 和 Nc-Buffer C 进行预冷。

3. 称组织重量，每 100 mg 组织中加入 1 ml Nc-Buffer A（按照 1:99 比例在蛋白抽提前 2-3 分钟内加入 Protease Inhibitor Cocktail），用匀浆器在冰上充分匀浆，放置在冰上孵育 20 分钟。

注意：各种组织的特性不同，需要根据不同组织调整 Nc-Buffer A 的用量，如果蛋白浓度小，按比例减少 Nc-Buffer A 及后续 Nc-Buffer B、Nc-Buffer C 的用量。

4. 加入 55 μ l Nc-Buffer B，涡旋 5 秒以充分混匀，放置在冰上孵育 1 分钟。

5. 4℃ 12,000 rpm 离心 15 分钟，收集上清（尽量收集干净上清液）至新的离心管中，-20℃ 保存（此提取液为胞浆蛋白）

6. 向上步所得的沉淀中加入 500 μ l Nc-Buffer C（使用前按照 1:99 比例加入 Protease Inhibitor Cocktail），涡旋 5 秒以充分混匀，重悬沉淀，冰上孵育 40 分钟，每隔 10 分钟涡旋混匀一次，每次约 15-30 秒。

7. 4℃ 12,000 rpm 离心 15 分钟，收集上清（尽量收集干净上清液）至新的离心管中，-20℃ 保存（此提取液为胞核蛋白）。