

膜蛋白，核蛋白和胞质蛋白抽提试剂盒

说明书修订日期： 2021.06.25

产品编号： KGBSP002

Store at -20°C for 12 months

For Research Use Only (科研专用)

一、产品简介

本试剂盒用于从哺乳动物组织和培养细胞中提取膜蛋白，核蛋白和胞质蛋白，提取制备过程简便。制备的膜蛋白，核蛋白和胞浆蛋白能保持天然活性，并且纯度较高。提取的蛋白可用于进一步的转录因子活性分析、凝胶阻滞实验(Gel Shift Assay)、免疫共沉淀、Western Blotting、酶活性测定等后续蛋白质研究，可以用于培养细胞或动物组织中蛋白质的提取。

每次可以处理 10^7 个细胞或 100mg 动物组织，由溶液 A，溶液 B，溶液 C，DTT，蛋白酶抑制剂，磷酸酶抑制剂，PMSF 组成，可以使用 50 次。

二、产品特点

1. 提取的蛋白最大限度地保持活性，可以用于 Pull Down, EMSA, IP, Enzyme Activity Assay 等实验。
2. 内含有的蛋白酶和磷酸酶抑制剂可以避免蛋白质的酶解和蛋白质磷酸化状况被破坏。
3. 整个实验过程只需要一个小时左右。无需要超速离心，可以并行处理多个样本。
4. 即可以用于培养细胞 (50×10^7 个)，有可以用于动物组织 (50×100 mg) 蛋白质的提取。

三、试剂盒组成

组份	规格 50 tests	储存条件
溶液 A	80 mL	2-8°C
溶液 B	30 mL	
溶液 C	30 mL	
DTT	150 μ L	-20°C
蛋白酶抑制剂	150 μ L	
磷酸酶抑制剂	750 μ L	
PMSF	1500 μ L	

四、运输和保存条件

低温运输，收到后，溶液 A，C 如长期不用可-20°C 保存，短期 (1-2周) 内使用可4 保存；DTT，蛋白酶抑制剂，PMSF 和磷酸酶抑制剂在-20°C 的环境中保存，保质期一年。

五、操作步骤

1. 对于悬浮培养的细胞，取培养细胞 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个，弃去培养液，细胞用预冷的一倍 PBS 洗涤两遍。

2. 如果是组织样本, 将 100 mg 组织剪切成小块, 加入适量的冰冷 PBS 洗涤两次后, 4℃ 离心 700×g, 3 min, 弃上清。
3. 将以上收集的细胞或组织中加入 1000 μL 预冷的溶液 A【使用前每 1 mL 溶液 A 加入 1 μL DTT, 10 μL PMSF, 1 μL 蛋白酶抑制剂和 5 μL 磷酸酶抑制剂】, 置玻璃匀浆器冰上均质 30~50 次, 或超声破碎细胞, 每次 30 S, 3~4 次, 每次间隔 1 min, 置于冰上冷却。均质或超声破碎细胞后应镜检, 细胞破碎率不小于 90%。
4. 涡旋震荡 10s, 冰上放置 20 分钟, 期间取出震荡 3-5 次, 再于 4℃, 12000 rpm 离心 10 min, 上清为胞质蛋白部分, 分装并保存于-80℃, 避免反复冻融。**注意: 对于沉淀, 可以用 250 μL 的溶液 A 进行清洗 1-2 次, 再进行步骤 5, 以减少残留的胞质蛋白对下游提取的污染。**
5. 在沉淀中加入 500 μL 预冷的溶液 B【使用前每 1 mL Buffer B, 1 μL DTT, 10μL PMSF, 1 μL 蛋白酶抑制剂和 5 μL 磷酸酶抑制剂】, 涡旋震荡 10s, 在冰上放置 10 分钟, 期间取出震荡 2-3 次, 再 4℃, 12000 rpm, 离心 10 min, 取上清, 作为核蛋白部分, 分装并保存于-80℃, 避免反复冻融。**注意: 对于沉淀, 可以用 250 μL 的溶液 A 进行清洗 1-2 次, 再进行步骤 6, 以减少残留的核蛋白对下游提取的污染。**
6. 在离心沉淀物中加入 500 μL 预冷的溶液 C (使用前每 1mL Buffer C, 1μL DTT, 10μLPMSF, 1μL 蛋白酶抑制剂和 5μL 磷酸酶抑制剂), 最大转速涡旋剧烈振荡 10s, 超声破碎 10 秒, 再置于摇床中冰浴 10 min, 期间取出震荡 2-3 次。
7. 4℃, 12000rpm, 离心 10min, 尽快将上清转入一预冷的洁净微量离心管, 即得膜蛋白; 分装并保存于-80℃, 避免反复冻融。

六、注意事项

1. 所有的试剂及器具均需预冷后使用, 以保证蛋白质的完整性。细胞或组织量需达到要求。
2. 因为不同蛋白质和不同的实验, 所需要的缓冲体系不同, 提取后的蛋白质样品, 特别是核蛋白, 如有必要, 可透析除去其它一些盐份。
3. 可以使 (KGBSP090) Sephadex 重力型脱盐柱脱盐或将缓冲液替换为实验所需要的目的蛋白质的合适缓冲液。
4. 对提取的膜蛋白和核, 胞浆蛋白, 可以采用我公司生产的 Bradford 法蛋白质浓度定量试剂盒 (KGP803) 或 Lowry 法蛋白质浓度定量试剂盒 (KGP4200) 或 BCA 法 (KGPBCA) 对提取样品中的蛋白质进行定量。
5. 如果用于蛋白质质谱研究, 请用质谱用快速银染试剂盒 (KGBSP021) 对胶上的蛋白质进行染色, 这些染色方法对蛋白质没有修饰作用, 所以对质谱图没有影响。对于一般的染色, 可以采用考马斯亮蓝染色。
6. 使用后, 请旋紧瓶盖, 防止溶液挥发和与空气的物质发生化学反应。
7. 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。