

Minute™ 核膜蛋白提取试剂盒

目录号：NE-013

描述：

核膜蛋白是一种非常复杂的膜蛋白系统，由于核膜与细胞核细胞质相连所以非常难以分离和纯化。传统方法提取和纯化需要非常大的样本量，并且过程乏味冗长。Minute™ 核膜蛋白提取试剂盒是第一个可以快速分离天然核膜蛋白及相连蛋白的商业试剂盒，无需使用梯度离心，超速离心。由于使用专利离心管柱技术，使得操作简单，快速，易用，并有效富集核膜蛋白。不像传统方法那样需要大量样品，起始样品量仅需 10-20million 个细胞，缓冲液不含表面活性剂和 EDTA，操作时间<45 分钟，并可获得 10-50ug 蛋白/样品。

应用：

试剂盒提取的核膜蛋白可应用于 SDS-PAGE, immunoblottings, ELISA, IP, 蛋白质运输分析, 酶活性测定及其他应用。试剂盒提供了一个快速富集天然核膜蛋白的方法。

试剂盒组份：

1. 25 ml 裂解液 A
2. 15 ml 裂解液 B
3. 50 个离心管柱
4. 50 个收集管

储存：

-20°C 储存

所需附加材料

1XPBS
涡旋震荡仪
台式离心机

重要产品信息

1. 仔细阅读整个操作说明。将缓冲液 A 和缓冲液 B 完全解冻后摇匀，放置于冰上。将离心管柱和接收管套管放置于冰上预冷。
2. 所有离心步骤都需要在 4°C 室温下或者低温离心机中进行。
3. 研究蛋白磷酸化，磷酸酶抑制剂应在使用前加入缓冲液 A 中。蛋白酶抑制剂可以选择添加或不添加。
4. 推荐使用 BCA 法测定蛋白浓度。

核膜蛋白分离步骤

1. 将离心管柱放入接收管中，放置冰上预冷。
2. 低速离心 (500-600Xg, 5 分钟) 收集 10-20million 细胞或组织中分离出的细胞。从动物组织中获取单细胞推荐使用 Minute™ 单细胞分离试剂盒 (Cat# SC-012)。
3. 用 1ml 预冷的 PBS 清洗细胞一次，去除上清，加入 0.5ml Buffer A 中重悬细胞。冰上孵育 10 分钟。涡旋大力震荡 10-20 秒。迅速将细胞悬液转入离心管柱中。盖上盖子，14,000xg 离心 30 秒。**(需要最短时间达到设定转速)**
4. 弃去离心管柱。将接收管中上清液完全去除。加入 1ml 预冷的 PBS 涡旋大力震荡 10 秒清洗沉淀 (沉淀为细胞核)。500xg，离心 2 分钟后，将 PBS 完全去除。
5. 加入 300ul buffer B 到管中，涡旋大力震荡 10 秒重悬沉淀。冰上孵育 5 分钟，涡旋大力震荡 10 秒。再次重复冰上孵育 5 分钟，涡旋大力震荡 10 秒一次。因为不同的细胞对缓冲液 B 的敏感性不同。如果你发现这一步核很黏，说明缓冲液 B 对你的细胞来说强度有点大。可以用预冷的 1xPBS 稀释缓冲液 B 来解决这个问题。可以尝试缓冲液 B 和 PBS 按照 8 : 2 ; 6 : 4 或者 1 : 1，最佳稀释度需要通过实验来确定。
6. 5000xg，4°C，离心 5 分钟，弃去沉淀 (这一步沉淀为去除的 DNA 残团)，小心的将上清液转移到一个新的 2.0ml 离心管中。加入 0.8ml 预冷的 PBS,反复倒置 10 次(此步骤是在提取核膜)。
7. 16,000xg，4°C,离心 15 分钟。去除上清，保留沉淀 (沉淀是分离出的核膜)。蛋白产量通常为 10-50ug/样品。如果需要较多的蛋白，可以多做几管样品将沉淀合并。核膜蛋白可以使用含有

表面活性剂的缓冲液来溶解。推荐使用下表中 Minute™ 系列溶解液溶解核膜蛋白。做等电聚焦 (2D 凝胶第一维) 我们建议使用: 7M 尿素/2M 硫脲/2%Chaps 和 20mM DTT (使用前将 DTT 加入以上混合液中)。

推荐按照下游实验应用选购以下蛋白溶解液溶解

产品名称	货号	下游实验应用
Minute™ 变性蛋白溶解液	WA-009	SDS-PAGE 电泳, WB, 胰酶消化, 用生物素标记或组氨酸标记纯化蛋白质等实验
Minute™ 非变性蛋白溶解液	WA-010	ELISA, IP, CO-IP, 酶活性检测等其他应用
Minute™ 质谱专用蛋白溶解液	WA-011	胰酶消化及后续的质谱分析

常见问题

问题	解决方案
低蛋白产量	增加起始细胞/组织的数量 增加第三步孵育时间到 15 分钟
低蛋白活性	保证裂解液低温/添加蛋白酶抑制剂
5000xg 离心后 (第 6 步) 上清液变得太粘稠无法吸取	减少起始细胞的数量
核膜组分中有胞浆蛋白污染	用 0.5ml 清洗 buffer (含 0.3M NaCl in 100mM Tris-HCl, PH9.0) 清洗核膜沉淀

更多信息和活动请扫描
二维码关注官方公众号

