

Minute™ 核蛋白酶体富集试剂盒

目录号 PN-041

描述：

蛋白酶体是一种非溶酶体形式的细胞内降解途径，需要代谢能量和泛素聚合物。26s 蛋白酶体是由两种亚基构成（1 个 20s 蛋白酶体和 1 或者 2 个 19s 调节复合物）。蛋白酶体被发现主要分布在细胞质中，但是在胞核中也可检测到。传统方法，通常使用超高速离心和亲和法分离蛋白酶体。这些方法，虽然相对有效，但是通常耗时且产量低。多数以亲和为基础的方法都需要苛刻的洗脱条件，这些会影响蛋白酶体的活性，限制下游应用，且该方法不能区分来源于胞质或细胞核的蛋白酶体。为了克服以上困难，我们利用离心管柱技术研发了此款细胞核中富集蛋白酶体的试剂盒（**胞浆蛋白酶体富集试剂盒 Cat# PT-040**）。该方法简单、快速、产量高。优化的缓冲液体系可维持蛋白酶体与泛素和其他蛋白质的作用，有助于蛋白酶体结构和功能的研究。高度富集的蛋白酶体也可用作亲和纯化的起始材料。

试剂盒组分（20 次）

- | | |
|----------------|------|
| 1. 缓冲液 A | 30ml |
| 2. 缓冲液 B | 8ml |
| 3. 1.5ml 锥型研磨杵 | 2 根 |
| 4. 研磨棒 | 2 根 |
| 5. 1.5ml EP 管 | 20 个 |
| 6. 离心管柱和收集管 | 40 套 |
| 7. 研磨粉 | 2g |

所需附加材料

涡旋震荡仪

台式离心机（10s 内可以升速至 16000Xg）

运输储存：

常温运输，4℃ 储存

重要产品信息

1. 仔细阅读整个操作说明。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。
2. 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。实验前将蛋白酶抑制剂添加在缓冲液 A 和缓冲液 B 中。（添加抑制剂终浓度为 1x，例 100x 抑制剂，1ml 缓冲液中加 10ul 抑制剂）

操作方法：

注意：缓冲液 B 液室温下温浴，混匀备用。

1. 将离心管柱及接收管套管，**缓冲液 A 放在冰上预冷。**
2. **A 培养的细胞样品**，低速 500-600Xg 离心 5min，收集 30-40 x10⁶ 细胞，用预冷的 PBS 清洗细胞一次。用 500ul 缓冲液 A 重悬细胞沉淀，冰上孵育 5min。将细胞悬液转移至离心管柱上，转接步骤 3。
B 柔软的组织样品，将 50-60mg 组织样品（新鲜或冷冻），放置于离心管柱上，加 200ul 缓冲液 A，用塑料棒用力按压反复扭转研磨 2-3 分钟，研磨后再加 300ul 缓冲液 A 到离心柱中。转接步骤 3。
肌肉组织样品，需要将组织用锋利的刀片在玻璃器皿上将组织切成小片（肉糜状），再转移至离心管柱上，如上述研磨操作（注：研磨棒塑料棒可重复使用，用 70%酒精擦拭或用蒸馏水冲洗干净。）
3. 盖上盖子，颠倒混匀几次，16000X g 离心 30s。（**此步骤需离心机快速升速，10S 内到达 16000Xg 可提高得率**）（可选优化：对于细胞样品，重悬接收管中细胞，转移回同个离心管柱中再次过柱，可以增加产量）
4. 弃去离心管柱，盖上盖子，涡旋震荡混匀，600 X g 离心 5min，弃上清。
5. 加入 400 ul 缓冲液 A 重悬沉淀，并转移至 1.5ml 离心管（**注：此步需使用试剂盒中提供的 1.5ml 离心管**）。800Xg 离心 3min。完全去掉上清，加 50ul 缓冲液 A 和 60-80mg 研磨粉到沉淀里。
6. 用 1.5ml 锥型杵研磨沉淀 2-3min（延长研磨时间，可以增加得率）。再加 400ul 缓冲液 A，用 1ml 吸头移液器上下吹打混匀，然后将裂解物转移到新的一套离心管柱中。
7. 盖上盖子，16000Xg，离心 15min。将 400ul 上清转移到新的 1.5ml 的离心管（**注：此步使用实验室自备 1.5ml 离心管即可**），上清是提取的**天然的核基质蛋白**。如果需要，可直接用于亲和纯化蛋白酶体的起始材料。
8. 上清中加入 400ul 缓冲液 B（上清液和缓冲液 B 的比例是 1：1）涡旋混匀，冰上孵育 10min。
9. 16000Xg 离心 10min，将上清倒掉。沉淀即是富集的**核蛋白酶体**。再次 16000Xg 离心 2min，将残留液体完全去除干净。可使用 50-150ul PBS 或者根据下游实验选择合适的缓冲液重悬蛋白酶体沉淀。大多数情况下，沉淀的蛋白酶体会附着在管壁上，用移液器吹打管壁，以确保沉淀完全重悬。重悬的蛋白酶体中含有盐分可能会影响 2D 凝胶分析。盐分可以通过透析或脱盐柱去除。

更多信息和活动请扫描
二维码关注官方公众号

