

Minute™ 哺乳动物细胞/组织无表面活性剂的 核基质分离试剂盒

目录号:NM-033

描述：

核质，也称为核质/核 SAP，由染色体、核仁和核基质组成。核质在基因信息传递和基因表达调控中起着核心作用。传统的核蛋白分离是通过含有表面活性剂的缓冲液提取的，在提取总的核蛋白方面是有效的，但不能分离核膜结合蛋白和水溶性基质蛋白。无表面活性剂的核基质蛋白提取试剂盒使用离心管柱技术可将细胞蛋白分离成三个部分：胞质、核基质和不溶性组分（主要是核膜和核酸相关蛋白）。使用的缓冲液中不含表面活性剂和 EDTA。整个操作可在一小时内完成，所提取的蛋白质处于天然状态，可用于许多下游应用，如凝胶阻滞、转录因子分析、细胞凋亡和蛋白质转运研究。

试剂盒组分(20T):

1. BufferA 30ml
2. BufferB 5ml
3. 离心管柱 20 个
4. 收集管 20 个
5. 研磨棒 2 个

运输及储存： 常温运输，4 度储存。

附加材料

台式离心机(10s 内可以达到 16,000Xg)

重要产品信息

该试剂盒可以将细胞分成三个组分，各个组分的纯度会因为细胞和组织样品类型不同有所差异。建议在提取前将蛋白酶抑制剂和/或磷酸酶抑制剂加到 Buffer A 和 Buffer B 中。（请按照蛋白酶或磷酸酶抑制剂母液比例，例如母液是 100x，添加时按照 1: 100 添加，1ml 缓冲液中添加 10ul 抑制剂）。推荐使用 BCA 法测定蛋白质浓度。缓冲液需在冰上预冷，所有离心均需 4 度离心。

培养的细胞样品（新鲜或冷冻）：

1. 500Xg，离心 3min，收集大约 1×10^7 - 3×10^7 个细胞。将细胞沉淀用 1ml 预冷的 PBS 清洗一次，完全去除上清。
2. 用 500ul 预冷的 Buffer A 将细胞重悬，在冰上孵育 5-10min。孵育完成后，大力涡旋振荡 20-30s 重悬细胞，将细胞悬液转到离心管柱套管中。
3. 离心机 14,000Xg-16,000Xg(离心机 10s 内可以达到 16,000Xg，可以提高得率)离心 30s，用移液器将接收管中的沉淀上下吹打重悬，将接收管中的悬液再次转回到离心管柱中再过一次柱子。
4. 将离心柱弃去，大力涡旋震荡 10 秒重悬沉淀，500Xg 离心 2min，取出上清液（上清液是胞浆组分，如需要此组分可保存，如需提高胞浆纯度可以将取出的上清液再次 16,000Xg，4 度离心 30min）。
5. 用 0.5ml 预冷的 Buffer A 将步骤 4 中的沉淀清洗两次（500Xg，离心 2 分钟），完全除去上清液。沉淀中加入 50-200ul 预冷的 Buffer B，用移液器上下吹打 10-20 次重悬沉淀。大力旋涡震荡 15-20 秒。将管放置在冰上孵育 10min，期间涡旋振荡几次。Buffer B 的用量根据沉淀块的大小决定，培养的细胞一般用 50-100 μ l，组织样品一般用 100-200 μ l。如果最终核基质蛋白产率低，可将此步骤的沉淀在-80 度下冷冻 10min，室温下解冻，并如上所述提取基质蛋白。注意：通过-80 $^{\circ}$ C 冷冻可以提高产量，但也可能增加组间交叉污染。
6. 16,000 Xg，离心 10-15min，并将上清液转移到一个新离心管中（上清是核基质组分），沉淀部分是非水溶性组分（WIF，主要含有核膜和核酸结合组蛋白）。如果不立即使用提取的核基质蛋白，需将蛋白酶抑制剂添加到蛋白样品中，储存在-80 度以备将来使用。如果非水溶性组分中有核基质蛋白的污染，可以用 0.5ml 预冷 PBS 清洗沉淀一次（16,000Xg，离心 5 分钟）。根据使用细胞/组织类型不同得率不同，通常为 50-200 μ g/样品。

注：提取的核基质蛋白盐离子浓度比生理盐浓度高。对于某些下游实验，可能需要用水 1:1 稀释之后使用。

组织样品（新鲜或冷冻）：

1. 在离心管柱套管中加入 20-30mg 组织，在冰上完全融化冰冻的组织。在离心管柱中加入 200 μ l 预冷 Buffer A，用研磨棒反复向下按压扭转研磨约 1-2min。（研磨棒可重复使用，用水清洗干净，用纸巾擦干即可）。
2. 再次加入 300 μ l 预冷 Buffer A 到离心管柱中，**开盖**在冰上孵育 5min。盖上盖子，翻转管子混匀，确保组织全部重悬。16,000X g，离心 30s，将收集管中的沉淀吹打重悬，加回到离心管柱套管中，再次 16,000X g，离心 30s 过柱一次。后续步骤参见上面细胞样品的步骤 4 到步骤 6。

非水溶性组分的溶解：

非水溶性组分可根据下游实验选择合适的溶解液进行溶解。

推荐按照下游实验应用选购以下蛋白溶解液

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

更多信息和活动请扫描
二维码关注官方公众号

