

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）。蛋白酶体主要存在于细胞质中，但也存在于细胞核中。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。且大多数情况下这些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从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**可以使用 Cat# PT-040 获取）。本方法简单、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 Preps):

1. 缓冲液 A	30ml
2. 缓冲液 B	8ml
3. 1.5ml 研磨杵	2 根
4. 离心管柱和收集管	40 套
5. 蛋白提取粉	2g

所需附加材料

涡旋振荡仪

台式离心机 (10s 内可以升速至 16,000X g)

运输储存：

常温运输，4℃储存。

重要产品信息：

1. 操作前仔细阅读整个操作说明。所有离心步骤都需要在 4℃室温下或者低温离心机中进行。
2. 如果您的研究涉及蛋白质磷酸化，磷酸酶抑制剂应在使用前加入缓冲液 A 中。蛋白酶抑制剂在实验前需要添加在缓冲液 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 液需要恢复室温，充分混匀备用。

1. 将离心管柱插入接收管形成套管，放在冰上预冷。**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套管中，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），放置于离心管柱套管上，加入 200ul 缓冲液 A，用试剂盒提供的研磨杵**平端**反复向下按压扭转研磨 2-3 分钟，研磨后再加入 300ul 缓冲液 A 到离心柱中。转接步骤 3。
肌肉组织样品：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），再转移至离心管柱套管上，如上述研磨操作（注：研磨杵可重复使用，用 70%酒精擦拭或用蒸馏水冲洗干净即可。）
3. 盖上盖子，翻转倒置套管几次混匀样品，16,000Xg 离心 30s。**（此步骤需离心机 10s 内到达 16,000Xg）**
（可选优化：对于细胞样品，过柱后可重悬接收管中细胞沉淀，再转移回同个离心管柱中再次过柱增加产量）
4. 弃去离心管柱，盖上盖子，涡旋振荡混匀样品，600 X g 离心 5min，弃上清。
5. 加入 400 ul 缓冲液 A 重悬沉淀，并转移至一个 **1.5ml** 离心管中。800X g 离心 3min。完全去掉上清，再

加 50ul 缓冲液 A 和 60-80mg 蛋白提取粉到沉淀里。

6. 用研磨杵**尖端**研磨沉淀 2-3min（延长研磨时间，可以增加得率）。加入 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**一套离心管柱套管中。
7. 盖上盖子，16,000X g，离心 15min。将 400ul 上清转移到新的 1.5ml 的离心管，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）涡旋振荡混匀，冰上孵育 10min。
9. 16,000X g 离心 10min，弃掉上清液，沉淀即是富集的**核蛋白酶体**。再次 16,000X g 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沉淀，蛋白实验推荐使用 **WA-009 /WA-010/WA-011** 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，一定要沿着管壁用移液器上下吹打，以确保沉淀完全重悬。如进行 2D 凝胶分析，重悬的蛋白酶体中含有盐分可能会有影响，盐分可以通过透析或脱盐柱去除。

推荐按照下游实验应用选购以下蛋白溶解液溶解蛋白酶体

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

