

## 细胞膜/细胞质/细胞核蛋白提取试剂盒使用说明书

### 【包装规格】

产品编号	产品名称	包装
EK-6005	细胞膜/细胞质/细胞核蛋白抽提试剂盒	50T/100T
EK-6005-1	Buffer C	60ml/120ml
EK-6005-2	Buffer N	6ml/12ml
EK-6005-3	Buffer M	6ml/12ml
	使用说明书	1 份

### 【保存条件】

-20℃ 保存一年

### 【操作方法】

**A: 对于贴壁细胞:** 用 PBS 洗一遍, 用细胞刮子刮下细胞, 或用 EDTA 溶液处理细胞使细胞不再贴壁很紧, 并用移液器吹打下细胞。离心收集细胞, 尽最大努力吸尽上清, 留下细胞沉淀备用。(注: 尽量避免用胰酶消化细胞, 以免胰酶降解需抽提的目的蛋白。)

**B: 对于悬浮细胞:** 用预冷的 PBS 清洗一遍, 离心收集细胞, 尽最大努力吸尽上清, 留下细胞沉淀备用。

**C: 对于组织:** 建议先用将组织剪成小块, 然后使用匀浆器加入预冷缓冲液 C 匀浆 (冰上处理)。注意: 手动方法可能适用于某些软组织, 例如大脑。

#### 1. 从组织/细胞中提取各组分蛋白

① 使用前在 Buffer C、N、M 中加入蛋白酶抑制剂(磷酸化研究则需同时添加磷酸酶抑制剂, 现配现用)。

② 收集细胞, 建议数量 5-10×10<sup>6</sup> 个细胞, 加入 240μl 移液预冷缓冲液 C (含抑制剂)。

如有必要, 可以增加使用更多缓冲液 C。不建议降低使用量, 因为如果溶液变得太稠, 这将影响细胞成分的分离。组织量最小不小于 40mg (每 g 组织加入约 2ml 预冷缓冲液 C), 太小的组织蛋白提取出来后浓度过低。

③ 通过涡旋使细胞充分分散, 持续 20 秒或至细胞完全分散。

若细胞贴壁过紧无法涡旋分散则用移液器吹打至均匀, 组织则加入缓冲液 C 后低温匀浆至完全均质化。

④ 在 4℃ 下孵育混合物 10 分钟 (震荡孵育有助于更好裂解)。

⑤ 将混合物在 4℃ 下以最高转速或 13,000 g 转速下离心 10 分钟。吸出上清液并将其保存到另一个干净离心管中, 上清液即为细胞质蛋白。

沉淀包含膜、细胞核部分，放在冰上继续后续操作。离心转速越高越利于分离，离心时间亦可延长至 20 分钟。

⑥ 加入 300 $\mu$ l 预冷缓冲液 C（无需蛋白酶抑制剂等）洗涤并重悬沉淀。

每克组织加入 1.5ml 预冷缓冲液 C 清洗。

⑦ 在 4 $^{\circ}$ C 下孵育混合物 5 分钟（震荡孵育有助于更好清洗）。

本步骤主要目的是清洗，低温下有利于蛋白稳定。

⑧ 在 4 $^{\circ}$ C 下再次以最高转速或 13,000 g 转速下离心 10 分钟。小心地倒掉上清液并丢弃，必要时用纸巾擦拭管子的边缘。

该洗涤步骤仅有助于减少与细胞质蛋白的交叉污染，如果需要，可以重复多一次该步骤以减少交叉污染。

⑨ 向沉淀中加入 100 $\mu$ l 预冷缓冲液 N，并从上一步骤中重悬沉淀。

⑩ 在 4 $^{\circ}$ C 下孵育混合物 10 分钟（震荡孵育有助于更好裂解）。

⑪ 在 4 $^{\circ}$ C 下以最高转速或 13,000 g 转速下离心 10 分钟。取出上清液并将其保存到另一个离心管中，核蛋白位于该上清液中。

剩余含膜蛋白沉淀离心管放在冰上，继续下游操作。

⑫ 用每克组织 300 $\mu$ l 预冷缓冲液 C（无需蛋白酶抑制剂等）洗涤并重悬沉淀。

本步骤主要目的是清洗，低温下有利于蛋白稳定。

⑬ 在 4 $^{\circ}$ C 下再次以最高转速或 13,000 g 转速下离心 10 分钟。小心地倒掉上清液并丢弃，必要时用纸巾擦拭管子的边缘。

该洗涤步骤仅有助于减少与细胞核蛋白的交叉污染，如果需要，可以重复多一次该步骤以减少交叉污染。

⑭ 向沉淀中加入每克组织 100 $\mu$ l 预冷缓冲液 M 并重悬。

⑮ 在 4 $^{\circ}$ C 下摇床震荡轻轻混合混合物 20 分钟（可增加超声 10 秒促溶解）。

建议增加超声过程有助于膜蛋白的溶解，10 秒每次，可多次超声。

⑯ 在 4 $^{\circ}$ C 下以最高转速或 13,000 g 离心 10 分钟。取出上清液并将其保存到另一个离心管中，膜蛋白位于该上清液中。

### 【注意事项】

1. 该产品仅实验室使用，不适合农业/家庭/临床用途使用。
2. 为了您的安全与健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。