

天
净
沙
系
列

CAT#:90613-50

低温运输和保存

TIANDZ

细胞核蛋白提取试剂盒（溶胀法）

Nuclear Protein Preparation Kit

使用手册 V1.0

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

<p>产品及特点</p>	<p>DNA 只存在于细胞核内,因此参与转录调节和 DNA 复制的蛋白质主要存在于细胞核中,要研究蛋白质与 DNA 的相互作用,首先需要制备能够与 DNA 作用的天然细胞核蛋白质。目前、细胞核蛋白质制备方法一般都比较繁琐,一次处理大量样品时尤其不便,为此本公司基于溶胀法原理开发了本产品,用于从哺乳动物组织和培养细胞核蛋白的温和微量提取,它具有下列特点:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 提取制备过程简便,只需要一小时。 2. 实验重复性好,尤其适合同时处理多个样品。 3. 可用于培养的动物细胞,也可以用于新鲜组织细胞。 4. 提取步骤温和,制备的核蛋白能保持天然活性,可以直接用于转录因子活性分析、凝胶阻滞实验(gel shift assay)、免疫共沉淀、Western Blotting、DNA 足迹图实验和甲基化干扰实验酶活性测定等研究。 5. 1×10E6 个细胞中可以得到 50-70 ug 的核蛋白质。 6. 只适用于哺乳动物组织和培养细胞,不适用于植物和真菌等生物。 			
<p>规格及成分</p>		<p>成份</p>	<p>编号</p>	<p>小扁盒包装</p>
		<p>动物细胞溶胀液</p>	<p>91203</p>	<p>50 mL</p>
		<p>动物细胞核溶胀液</p>	<p>90613b</p>	<p>10 mL</p>
		<p>使用手册</p>	<p>90613sc</p>	<p>1 份</p>
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输和保存,有效期一年。</p>			
<p>自备试剂</p>	<p>PMSF、DTT、PBS、胰酶溶液等</p>			
<p>使用方法</p>	<p>实验前准备: 取适当量(根据样品数量确定)的动物细胞溶胀液和动物细胞核溶胀液到新的塑料瓶中,置于冰上预冷,并在使用前数分钟内同时向动物细胞溶胀液和动物细胞核溶胀液中加入自备的 PMSF 和 DTT,使 PMSF 的最终浓度为 0.2 mM, DTT 的最终浓度为 1 mM。实验中所用试剂均需先预冷。</p> <p>一、提取培养细胞和悬浮细胞细胞核:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 培养细胞: 将覆盖率为 55-65%的培养细胞用自备的胰酶溶液按标准的胰酶法处理,然后刮到 1.5 mL 塑料离心管中,4℃ 600g 离心 3 分钟,小心弃上清。细胞数量最好在 5×10E5-7 个。细胞沉淀体积约 0.1mL。 2. 悬浮细胞: 直接将 5×10E5-7 个悬浮细胞转移到 1.5 mL 塑料离心管中,4℃ 600g 离心 3 分钟,小心弃上清。细胞沉淀体积约 0.1mL。 3. 用 1mL 自备的预冷的 PBS 缓冲液重悬细胞沉淀,然后 4℃ 600g 离心 3 分钟,小心弃上清。注意:必须尽快用 PBS 缓冲液洗涤细胞沉淀,否则沉淀细 			

	<p>胞产生的 CO₂ 将使局部 pH 减低产生毒性。</p> <ol style="list-style-type: none"> 4. 在细胞沉淀中加入 1mL 预加了 PMSF 和 DTT 的动物细胞溶胀液，用手指轻柔弹管壁使细胞沉淀悬浮起来。最好不要用枪头。 5. 冰浴 10 分钟。如果有条件可以取少量样品涂片，在显微镜下观察，90%的细胞将呈现气球状。如果没有则继续冰浴直到 90%的细胞呈现气球状。 6. 涡旋激烈震荡 10-30 秒混匀。如果有 Dounce 玻璃匀浆器，也可以用预冷的匀浆器匀浆 10-12 次。如果有条件可以取少量样品涂片，在显微镜下观察，90%的细胞将破裂。如果未破裂细胞折光度高，并且没有膨胀，则表示这些细胞已经死亡。如果这样的细胞太多，则需要重新取样。 7. 4℃ 1000g 离心 3 分钟，小心弃上清。沉淀为细胞核，上清为胞浆成分，如果需要可以留存上清。 8. 在细胞核沉淀中加入 100 μL 预加了 PMSF 和 DTT 的、预冷的动物细胞核溶胀液，轻弹离心管混匀，使沉淀悬浮起来。 9. 冰浴 20 分钟。 10. 4℃ 1000g 离心 2 分钟，小心收集上清液（细胞核提取物），可立即用于后续的凝胶滞后实验、BCA 法蛋白浓度测定、活性检测、SDS-PAGE 电泳、2D 电泳等实验，也可以分装后放-70℃长期保存。 <p>说明：本方法可以从 1×10⁶ 个细胞中得到 50-70 ug 的核蛋白质。</p> <p>二、对新鲜组织：</p> <ol style="list-style-type: none"> 11. 将 100-150 mg 新鲜组织置于培养皿中，用手术剪将组织尽可能切成非常细小的碎片，尽量去除脂肪组织和结缔组织等非目的组织，用自备的 PBS 缓冲液洗涤 2 次，离心后去上清。在组织沉淀中加入 400 uL 预加了 PMSF 和 DTT 的动物细胞溶胀液，在预冷的玻璃匀浆器内充分匀浆。匀浆需在冰浴或 4℃ 进行。 12. 匀浆后把匀浆液转移到塑料离心管内，用手指弹管壁使沉淀悬浮起来，冰浴放置 10-20 分钟，涡旋激烈震荡 10 秒混匀。 13. 接下来按照步骤 7-10 操作，即得到新鲜组织细胞核蛋白提取物。
<p>注意事项</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 所有接触样品的用具和试剂均需预冷，以免蛋白质的降解及失活。 2. PMSF 一定要在抽提试剂加入到样品中前 2-3 分钟内加入，以免 PMSF 在水溶液中很快失效。 3. 本试剂盒只适用于新鲜的组织样品，对冻存过的组织抽提效果不是很理想。