

ACExtract Nuclear and Cytoplasmic Protein Extraction Kit

Cat# CE1017 – 50 Rxn | CE1018 – 250 Rxn

Storage at 4°C for 12 months

產品介紹

ACExtract Nuclear and Cytoplasmic Protein Extraction Kit 提供了一種簡單、方便從細胞或新鮮組織中抽取細胞核與細胞質的方法。約 90 分鐘即可分離細胞核與細胞質。抽取得到的蛋白質為非變性，有活性，可用於 Western、EMSA、footprinting、報告基因檢測以及酶活性檢測等後續操作。本試劑盒透過細胞質試劑 A 和 B，在低滲透壓條件下，使細胞充分膨脹後破壞細胞膜，釋放出細胞質，透過離心得細胞核沉澱。最後透過高鹽的細胞核蛋白抽取試劑得到核蛋白。本試劑盒可以抽取 50 個，數量為 2×10^6 個 Hela 細胞 (約 40mg) 的樣品。可根據需要按比例放大、縮小萃取規模。

試劑盒組成

試劑盒組成	保存條件	50 次
Cytoplasmic Extraction Reagent A	4°C	10 mL
Cytoplasmic Extraction Reagent B	4°C	0.55 mL
Nuclear Extraction Reagent	4°C	2.5 mL

注意事項

1. 需自備 PMSF，PMSF 一定要在抽取試劑加入樣品前 2-3 分鐘內加入，以免 PMSF 在水溶液中失效。
2. 抽取蛋白質所有步驟都需在冰上或 4°C 進行。
3. 本試劑盒僅適合於新鮮組織，對凍存過的組織抽取效果差。

操作步驟 (實驗前請先閱讀注意事項)

準備溶液：室溫溶解試劑盒中的三種試劑，溶解後立即放置在冰上，混勻。取適當量 Cytoplasmic Extraction Reagent A 備用，在使用前數分鐘內加入 PMSF 至最終濃度為 1mM。取適當量的 Nuclear Extraction Reagent 備用，在使用前數分鐘內加入 PMSF 至最終濃度為 1mM。如果目標蛋白含豐富的半胱氨酸，可在 Cytoplasmic Extraction Reagent A、Nuclear Extraction Reagent 中加入 DTT ([ACE #C3003](#)) 至最終濃度 0.5mM。

1. 對於貼壁細胞：用 PBS 洗一遍，用細胞刮勺刮下細胞，或用 EDTA 溶液處理細胞，吹打細胞(最好不用 Trypsin 消化，可能使蛋白降解)。500xg 離心 2-3 分鐘，盡可能吸棄上清液，留下細胞沉澱備用。接步驟 4。
2. 對於懸浮細胞：用 PBS 洗一遍，500xg 離心 2-3 分鐘，盡可能吸棄上清液，留下細胞沉澱備用。接步驟 4。

3. 對於新鮮組織：

- 1) 把組織盡可能切成細小的碎片。在 PBS 裡面勻漿製成細胞懸液，500xg 離心 2-3 分鐘，棄上清液，估計細胞沉澱體積，接步驟 4。
- 2) 把組織稱重後，把組織盡可能切成非常細小的碎片，按照每 50 mg 組織加入 500 μ l 的比例加入 Cytoplasmic Extraction Reagent A，勻漿後把勻漿液轉移到塑膠離心管內，接步驟 5。在步驟 7 按照每 200 μ l Cytoplasmic Extraction Reagent A 加 11 μ l 比例加入 Cytoplasmic Extraction Reagent B。
4. 每 20 μ l 細胞沉澱加入 200 μ l 添加了 PMSF 的 Cytoplasmic Extraction Reagent A。
(對於 2×10^6 個 HeLa 細胞，其細胞沉澱的體積大約為 20 μ l 或 40 mg。)
5. 最高速劇烈 Vortex 15 秒，把細胞沉澱完全懸浮並分散開。
(如果細胞沉澱沒有完全懸浮並分散開，可以適當延長 Vortex 時間。)
6. 冰浴 10-15 分鐘。
7. 加入 Cytoplasmic Extraction Reagent B 11 μ l。最高速劇烈 Vortex 5 秒，冰浴 1 分鐘。
8. 最高速劇烈 Vortex 5 秒，4°C 14,000-16,000g 離心 5 分鐘。
9. 立即吸取上清液至一預冷的離心管中，即為抽取得到的細胞質蛋白。可以立即使用，也可以凍存。
(千萬不要觸及沉澱，可以在沉澱上方保留極小體積的上清，以免觸及沉澱。)
10. 對於沉澱，完全吸盡殘餘的上清液，加入 50 μ l 添加了 PMSF 的 Nuclear Extraction Reagent。
11. 最高速劇烈 Vortex 15-30 秒，把細胞沉澱完全懸浮並分散開。然後放回冰浴中，每隔 10 分鐘再高速劇烈 Vortex 15 - 30 秒，共 40 分鐘。
12. 4°C 14,000 - 16,000xg 離心 10 分鐘。
13. 立即吸取上清液至一預冷的塑膠管中，即為抽提得到的細胞核蛋白。可以立即使用，也可以 -70°C 凍存。

問題與解決方法

問題	改善建議
細胞質蛋白產量低	細胞沒有裂解完全-建議：增加 Cytoplasmic Extraction Reagent B 用量比例 細胞團分散不完全-建議：Vortex 劇烈完全
細胞核蛋白產量低	細胞團分散不完全-建議：Vortex 劇烈完全 不完全細胞核分離-建議：加入 Cytoplasmic Extraction Reagent B 後，拉長離心時間
蛋白濃度低	抽取試劑和細胞團的體積比例不適合-建議：按照 20 μ l 細胞團（約 40mg）比例加 200 μ l Cytoplasmic Extraction Reagent A
蛋白活性低或者沒有活性	樣品沒有保持低溫操作-建議：始終低溫離心和保持樣品在冰上 蛋白酶活性偏高-建議：除了 PMSF，可加入多種 protease inhibitor 聯合抑制蛋白酶活性
細胞核蛋白和細胞質蛋白有嚴重的相互混合	細胞質抽取物未完全清除-建議：細胞核抽取前，仔細吸去所有的細胞質抽取上清液 細胞裂解不完全-建議：加大 Vortex 時間和冰浴時間 細胞裂解過度-建議：減少 Vortex 時間和冰浴時間 勻漿過度，不足或者不均勻-建議：優化勻漿時間和條件

細胞質/細胞核蛋白產量同時低或者沒有	可能和細胞種類有關-建議：該種細胞系可能不適合本方法
裂解過程中發現變得十分粘稠或者顯微鏡下發現細胞核裂解	裂解過度·細胞核也完全裂解·DNA 釋放出來了。-建議：減少 Cytoplasmic Extraction Reagent B 用量比例或者不加；減少 Vortex 時間和冰浴時間。