Waals™ Membranous, Cytoplasmic, and Nuclear Protein Extraction Kit

操作说明

- **描　述：**Waals™ Cytoplasmic and Nuclear Protein Extraction Kit，包含 Membranous Lysis Buffer、Cytoplasmic Lysis Buffer 及 Nuclear Lysis Buffer。
- **试剂盒储存：**4 ℃保存。
- **自备试剂：**蛋白酶抑制剂 Cocktail、磷酸酶抑制剂（按需）。
- **介　绍**

Waals™ Membranous, Cytoplasmic, and Nuclear Protein Extraction Kit 是一款综合性的蛋白质提取工具，专为研究人员提供从细胞中提取膜蛋白、细胞质蛋白和细胞核蛋白的全面解决方案。本试剂盒通过独特的配方和技术，能够分步且高效地裂解细胞，确保从同一细胞样本中分离得到纯净的膜蛋白、细胞质蛋白和细胞核蛋白。这种多层次的蛋白提取方法不仅简化了实验流程，还大大提高了蛋白提取的效率和纯度，非常适合进行复杂的蛋白质组学研究。

操作步骤

- **准备工作**

1. 准备足够的冰，以保持细胞在处理过程中的低温状态。
2. 准备好细胞样本，确保细胞数量足够且状态良好。

- **细胞收集与洗涤**

1. 收集 5 × 10^6 细胞于 1.5 mL 的离心管中，用预冷的 PBS 洗涤两次，去除培养基和血清中的杂质。
2. 离心收集细胞，去除 PBS。

- **细胞膜与细胞质蛋白提取**

1. 加入 250 μL Cytoplasmic Lysis Buffer（已加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂）重悬细胞，轻轻吹打混匀。
2. 在冰上孵育 10 分钟，期间每隔 2-3 分钟轻轻吹打混匀一次，以确保细胞充分裂解。
3. 1000 g 离心 10 分钟，收集上清至新离心管中（勿吸到沉淀，可适当保留部分液体），同时保留**沉淀一**（此部分包含细胞核蛋白），置于冰上。

4. 将步骤 3 中的上清 16000 g 离心 15 分钟，收集上清至新离心管中（勿吸到沉淀，可适当保留部分液体，该上清为细胞质蛋白），同时保留**沉淀二**（此部分包含细胞膜蛋白）。
5. 将**沉淀二** 16000 g 离心 1 分钟，尽量吸去上清（可接触到沉淀）。
6. 加入 100 μL Membranous Lysis Buffer（同样需加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂），在冰上孵育 10 分钟，期间每隔 2-3 分钟涡旋振荡一次。
7. 16000 g 离心 15 分钟，收集上清至新离心管中（该上清为细胞膜蛋白）。

■ **细胞核蛋白提取**

8. 将**沉淀一** 12000 g 离心 1 分钟，尽量吸去上清（可接触到沉淀）。
1. 加入 100 μL Nuclear Lysis Buffer（同样需加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂）。
2. 在冰上孵育 30 分钟，期间每隔 5 分钟涡旋振荡一次，以充分裂解细胞核。
3. 12000 g 离心 10 分钟，取上清至新的离心管中（该上清为细胞核蛋白）。

■ **蛋白浓度测定与保存**

1. 使用 BCA 法或其他蛋白浓度测定方法，对提取的细胞膜、细胞质和细胞核蛋白进行浓度测定。
2. 根据实验需求，将蛋白分装并保存于-80 ℃冰箱中备用。

■ **注意事项**

1. 所有操作均在冰上进行，以保持蛋白的活性。
2. 提取过程中要避免剧烈振荡，以防止蛋白降解。
3. 蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的用量按试剂说明进行准确添加。
4. 提取完成后，应尽快进行蛋白浓度测定并保存样品，以避免蛋白降解。

■ **常见问题与解决方案**

1. 提取的蛋白浓度过低：可能是细胞数量不足或提取过程中蛋白损失过多。建议增加细胞数量并优化提取条件。
2. 提取的蛋白质中含有其他成分：可能在吸液过程中接触到了其他成分或离心速度不够。建议严格按照操作步骤并调整离心条件。
3. 蛋白活性降低：可能是操作过程中温度过高或处理时间过长。建议严格在冰上操作并控制处理时间。