

# Minute™ 酵母/真菌细胞核和细胞质蛋白提取试剂盒

目录号:YN-058

## 描述:

Minute™ 酵母/真菌细胞核和细胞质蛋白提取试剂盒可以快速从酵母和真菌中分离细胞质蛋白和细胞核蛋白。本试剂盒易于操作,大约 1 小时即可分离出这两个组分,大幅度简化您研究工作的流程。试剂盒提供了高效提取蛋白所有必要的缓冲液和一次性工具,得到的细胞质蛋白和完整的细胞核,可用于核蛋白和核酸的提取。

## 试剂盒组分(20 preps):

1. 缓冲液 A	20ml
2. 缓冲液 B	20ml
3. 缓冲液 C	2ml
4. 蛋白提取粉	5g
5. 1.5 ml 离心管适用锥形研磨杵	2 个
6. 1.5 ml EP 管	20 个

**运输与储存:** 缓冲液 B 储存于-20°C, 其余部分室温储存。

## 附加材料:

台式离心机, ddH<sub>2</sub>O

## 重要产品信息:

在实验之前,须在室温下解冻缓冲液 B 后置于冰上。推荐将蛋白酶抑制剂添加到分装的缓冲液 A。

研究蛋白质磷酸化时，须同时在缓冲液 A 和 B 中添加磷酸酶抑制剂（请按照蛋白酶或磷酸酶抑制剂母液比例，例如母液是 100x，添加时按照 1: 100 添加，即 1ml 缓冲液中添加 10ul 抑制剂）。推荐使用 BCA 法测定蛋白质浓度。步骤 4-8 中所有离心须在 4°C 下进行。

## 操作步骤：

1. 使用**试剂盒中提供**的 1.5 ml 离心管，10,000 X g 离心 5 分钟收集对数生长期的酵母/真菌细胞。确保沉淀的湿体积在 100-120 $\mu$ l 之间。湿体积可通过与装有 100 $\mu$ l 水的 1.5 ml 离心管比较，估算沉淀体积。
2. 将沉淀重悬于 1 ml 预冷的 ddH<sub>2</sub>O 中，10,000 X g 离心 3 分钟，弃去上清。将 150-200 mg 蛋白质提取粉添加到管中，然后向管中加入 1 ml 预冷的 ddH<sub>2</sub>O。盖上盖子，10,000 X g 离心 3 分钟，完全取出并丢弃上清液。
3. 用试剂盒提供的锥形研磨杵向下按压扭转反复研磨沉淀约 3-4 分钟（300-400 次）。向管中加入 400 $\mu$ l 缓冲液 A，继续研磨约 30 次。（注：研磨杵可重复使用，用洗涤剂简单浸泡后用水冲洗并用纸擦干即可）。
4. 3,000 X g，4°C，离心 5 分钟。将所有上清液转移至新的自备预冷离心管中，并置于冰上。再次重复步骤 3 一次，并合并上清液（共计 800  $\mu$ l）于同一管中。
5. 将合并的上清液以 3,000 X g，4°C，离心 3 分钟，不要扰动沉淀小心地将上清液（这是细胞总组分）转移至新的自备 1.5 ml 离心管中，丢弃沉淀。
6. 将细胞总组分 10,000 X g，4°C，离心 10 分钟，**保留沉淀待用**，将上清液转移至新的自备 1.5 ml 离心管中，16,000 X g，4°C，离心 30 分钟。细胞壁漂浮在顶部，可以用移液器吸取上层去除。将澄清的上清液转移至新的自备离心管中，即是**细胞质组分**。
7. 步骤 6 中 10,000 X g 离心后的沉淀，加入 0.5 ml 缓冲液 B，用移液器上下吹打 30-40 次重悬，再加入 50 $\mu$ l 缓冲液 C 到管中（此步骤可选，具体请参阅下面技术说明），并短暂涡旋振荡。在 4°C，10,000 X g，离心 10 min，弃去上清液。
8. 重复步骤 7，再次用 0.5 ml 缓冲液 B 重悬沉淀后，再加入 50 $\mu$ l 缓冲液 C，涡旋震荡后，10,000 X g，

4°C，离心 10 分钟，弃去上清，沉淀即为**细胞核组分**，可用于蛋白质或核酸提取。通常，蛋白质产量约为 50-80 ug/样品。分离的细胞核组分可以根据下游不同的蛋白质实验，用含有去污剂的溶解液溶解成蛋白溶液，推荐以下的溶解液（见下表）。

**推荐按照下游实验应用选购以下蛋白溶解液溶解细胞核蛋白**

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

## 技术说明：

1. 如果检测胞核中胞质蛋白污染过多，可以将步骤 6 中的离心力从 10,000 X g 降至 8,000 X g，离心 10 分钟。
2. 缓冲液 A 和缓冲液 B 中均不含去污剂。缓冲液 B 为分离低强度洗涤缓冲液。
3. 缓冲液 C 含有非离子型去污剂，可以增强缓冲液 B 的洗涤强度。如果样品需要避免接触去污剂，可以省略缓冲液 C 的使用。
4. 如果需要充分分离单个细胞核，可将步骤 8 中的细胞核沉淀重悬于 100-200µl 含有 1% BSA 的 1X PBS 中，100X g 离心 3 分钟，将上清转移至一个新的自备离心管中即可，这就是分离的单个细胞核组分。

更多信息和活动请扫描  
二维码关注官方公众号

