

ProEx 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，有效期 12 个月

【概述】

本试剂盒采用不连续密度梯度离心与分步裂解技术，能够从同一样本中依次高效分离出纯度极高的细胞质（Cytoplasm）、细胞核（Nucleus）及细胞膜（Membrane）组分蛋白。

高纯度分离：配套特制的 Buffer C、N、M 缓冲体系，通过分步离心有效降低各组分间的交叉污染，实验结果背景清晰。

保持蛋白活性：温和的去污剂配方结合低温操作环境，最大限度地保留了蛋白质的生物活性和天然构象。

多组分联提：仅需单次样本制备，即可同步获取三大细胞组分，极大节省了样本量，尤其适用于临床组织或珍稀细胞样本。

兼容性广：提取的各组分蛋白可直接用于 Western Blot、免疫沉淀（IP）、凝胶阻滞实验（EMSA）及各种功能分析。

【操作流程概览】

样本准备 → Buffer C (提取胞质蛋白) → Buffer C (洗涤) → Buffer N (提取核蛋白) → Buffer C (洗涤) → Buffer M (提取膜蛋白)

【操作方法】

一、样品预处理

贴壁细胞：用预冷 PBS 洗涤 1-2 次，使用细胞刮刀刮下或 EDTA 处理使细胞脱落（避免使用胰酶，防止蛋白降解）。离心收集，弃尽上清。建议细胞量：5-10×10⁶ 个。

悬浮细胞：预冷 PBS 洗涤，离心收集，弃尽上清。建议细胞量：5-10×10⁶ 个。

组织样品：将组织剪碎。按 1g 组织:2mL 预冷 Buffer C（含抑制剂）比例加入缓冲液，冰上匀浆至完全均质化（建议≥40mg）。观察到液体变为均匀乳状、无明显块状物后进入下一步。

二、分步提取步骤

【准备工作】：使用前在 Buffer C、N、M 中加入蛋白酶抑制剂（如 ES-8135）。

1. 提取细胞质蛋白

- ① 离心收集 5-10×10⁶ 个细胞，加入 240μL 预冷 Buffer C（含抑制剂）。(如：组织用量 120mg)
- ② 涡旋 20 秒使完全分散（若组织则需完全均质化）。
- ③ 在 4°C 下孵育混合物 10 分钟（震荡孵育有助于更好裂解）。
- ④ 将混合物在 4°C 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**。

2. 洗涤（去除胞质污染）

- ① 加入 300μL 预冷 Buffer C，重悬后 4°C 震荡孵育 3-5 分钟。
- ② 4°C,13,000×g 转速下离心 10 分钟，弃上清。

3. 提取细胞核蛋白

- ① 加入 100μL 预冷 Buffer N（含抑制剂），重悬沉淀。
- ② 在 4°C 下孵育混合物 10 分钟（震荡孵育有助于更好裂解）。
- ③ 4°C,13,000×g 转速下离心 10 分钟。收集上清液即为**细胞核蛋白**，转移至新管；沉淀保留。

4. 洗涤（去除胞质污染）

- ① 加入 300μL 预冷 Buffer C，重悬后 4°C 震荡孵育 3-5 分钟。
- ② 4°C,13,000×g 转速下离心 10 分钟，弃上清。

5. 提取细胞膜蛋白

- ① 加入 100μL 预冷 Buffer M（含抑制剂），重悬沉淀。
- ② 在 4°C 下震荡孵育混合物 20 分钟，建议增加超声处理：每次 10 秒，可多次超声以促进膜蛋白溶解。
- ③ 4°C,13,000×g 转速下离心 10 分钟。收集上清液即为**细胞膜蛋白**，转移至新管。

【注意事项】

1. **比例控制：**Buffer C 用量不建议降低。若溶液过稠会严重影响组分分离效果。
2. **低温操作：**全程需在冰上或 4°C 环境中进行，以保证蛋白稳定性。
3. **样本保存：**提取得到的蛋白组分建议立即进行浓度测定（EK-5001 BCA 法，本试剂盒兼容 BCA），并分装冻存于-80°C。避免反复冻融。

4. **污染控制:** 洗涤步骤对于减少各组分间的交叉污染至关重要。
5. **高纯度推荐:** 如需更高纯度膜蛋白, 推荐使用 EK-6030 ProEx 天然膜蛋白提取试剂盒。
6. **安全防护:** 仅供科研使用。操作时请佩戴实验服及一次性手套。