

核蛋白与胞浆蛋白抽提试剂盒

货号：HKW2013

【产品信息】

产品名称	产品货号	规格	有效期
核蛋白与胞浆蛋白抽提试剂盒	HKW2013	30T/50T	一年

【产品简介】

此款细胞核蛋白与胞浆蛋白抽提试剂盒可高效的从动物组织或培养的细胞中分离核蛋白和胞浆蛋白，分离得到的核蛋白和胞浆蛋白纯度高，可用于研究蛋白在细胞内的定位。分离得到蛋白可用于蛋白免疫印迹、免疫沉淀等蛋白分析实验。

【产品组成】

产品组分		规格	
HKW2013-1	核蛋白抽提试剂 A	30 mL	50mL
HKW2013-2	核蛋白抽提试剂 B	5 mL	10mL
HKW2013-3	核蛋白洗涤液 A	30 mL	50mL
HKW2013-4	核蛋白洗涤液 B	30 mL	50mL
HKW2013-5	核蛋白稀释液	30 mL	50mL
HKW2013-6	SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (4×)	2 mL	4mL
HKW2013-7	普通型蛋白酶抑制剂混合液 (100×)	1 mL	2mL
HKW2013-8	0.4%台盼蓝溶液	1 mL	2mL

【储存与运输】

-20℃保存，一年有效。一个月内使用可4℃保存。

【使用方法】

1、提取前准备：将试剂盒中试剂室温解冻，解冻后放置于冰上。提前4℃预冷离心机。核蛋白抽提试剂A、核蛋白抽提试剂B、核蛋白洗涤液A、核蛋白洗涤液B根据提取的样本量分别取出对应体积的试剂，在使用前按100:1添加蛋白酶抑制剂

混合液（100×）备用。

2、样品预处理

a、对于细胞：收集细胞 4℃，500 g 离心 5 min，用预冷的 PBS 洗涤两遍，尽可能吸取残留的 PBS。然后在冰上，按每 2000–5000 万细胞直接加入 1 mL 的预冷核蛋白抽提试剂 A。

b、对于组织：取新鲜的动物组织，用预冷的 PBS 洗净组织块上附着的脂肪和血液等杂质，用滤纸吸干水分后称重，在离心管中将组织块剪碎，然后在冰上，按每 100 mg 组织加 1 mL 预冷的核蛋白抽提试剂 A。

3、将样品转移到合适大小的预冷玻璃匀浆器中，在冰浴条件下对样品匀浆。

注：不同的样品所需匀浆次数不同，培养细胞建议匀浆 1–2 次，组织样本建议 5–10 次。鉴定方法：取 20 μ L 匀浆 2 次后的细胞样品或匀浆 5 次后的组织样品，加入等体积的 0.4% 台盼蓝溶液，混匀，在显微镜下观察台盼蓝溶液染色阳性（蓝色）细胞数目的比例，当阳性（蓝色）细胞破碎达到 50% 即可停止匀浆，请勿过度匀浆。若阳性（蓝色）细胞比例未达到 50%，适当增加 1–2 次匀浆，随后按照同样的方法使用台盼蓝溶液进行鉴定。

注：对于培养的细胞也可以采用涡旋震荡法和反复冻融法来破碎细胞。

涡旋震荡法：将步骤 2 中已经加入了核蛋白抽提试剂 A 的样品，在涡旋仪上剧烈涡旋 1 min（涡旋 10 s，停 10 s），然后冰上放置 2 min，重复涡旋及冰上放置步骤 3 次，然后取少量样品台盼蓝染色检测其细胞破碎程度，如果细胞破碎程度不足 50%，可以增加剧烈涡旋次数，直到细胞破碎程度大于 50%。

反复冻融法：将步骤 2 中已经加入了核蛋白抽提试剂 A 的样品，在液氮和室温依次反复冻融两次，然后取少量样品台盼蓝染色检测其细胞破碎程度，如果细胞破碎程度不足 50%，可以增加反复冻融次数，直到细胞破碎程度大于 50%。

4、样品匀浆液在冰上孵育 10 min，期间每隔 2 min 上下颠倒一次，4℃，6500 g 离心 5 min，收集上清为胞浆蛋白。

注：吸取上清时不要触及沉淀，可以在沉淀上方保留部分上清。

5、收集沉淀，用 1 mL 的核蛋白洗涤液 A 重悬沉淀。4℃，6500 g 离心 5 min，收集沉淀。

6、沉淀中加入 1 mL 的核蛋白洗涤液 B 重悬沉淀，在涡旋仪上剧烈涡旋 1 min（涡旋 10 s，停 10 s）。4℃，6500 g 离心 5 min，再次收集沉淀。

7、沉淀中加入 100 μ L 的核蛋白抽提试剂 B 重悬沉淀。在涡旋仪上剧烈涡旋 2 min（涡旋 10 s，停 10 s），然后冰上放置 10 min，重复涡旋及放置步骤 3 次。

8、4℃，16000 g 离心 10 min，收集上清为核蛋白。

9、根据收集到的核蛋白样品的体积，加入 4 倍体积的核蛋白稀释液。此时如果收集到的核蛋白粘度高，可对样品进行超声波处理，直至样品不粘稠。

注：如果出现样品粘度太高导致步骤 8 离心后无法分离沉淀和上清，可先加入 4 倍

体积的核蛋白稀释液，并对样品进行超声波处理后再 4℃，16000 g 离心 10 min，收集上清（核蛋白）。

10、根据实验需要，按照 3:1 比例，混合蛋白样品和 SDS-PAGE 上样缓冲液。100℃沸水浴加热 5 min，以充分变性蛋白。冷却至室温后，直接上样到 SDS-PAGE 胶加样孔内即可。

【注意事项】

1. 本试剂盒提供的核蛋白抽提试剂 B 为高盐试剂，提取得到的核蛋白需要使用核蛋白稀释液按 1:4 调至生理盐浓度。

2. 本试剂盒采用两步洗涤法，可以分离得到高纯度的核蛋白和胞浆蛋白。

3. 本试剂盒中有 0.4% 台盼蓝溶液可用于鉴定匀浆效果，细胞破碎达到 50% 即可停止匀浆，请勿过度匀浆。

4. 如果每个样品的数量为 2000 万个细胞或 100 mg 组织，本试剂盒可以处理 30 个样品。

5. 所有步骤都需在低温下进行。

6. 本试剂盒对新鲜的组织样本具有很好的提取效果，对冻存的组织样本效果相对较差，客户优先选用新鲜的样本提取。

7. 不同的样品中核蛋白的含量不同，可根据实验情况调整核蛋白抽提试剂 A 和核蛋白抽提试剂 B 的使用量。

8. 核蛋白抽提试剂 A、核蛋白抽提试剂 B、核蛋白洗涤液 A、核蛋白洗涤液 B 在使用前添加普通型蛋白酶抑制剂混合液。用于磷酸化抗体检测还需提前加入磷酸酶抑制剂混合物。

9. 本试剂盒中的普通型蛋白酶抑制剂混合液适用于常规蛋白的提取，针对特别容易降解的蛋白推荐使用增强型蛋白酶抑制剂混合液。

10. SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液中含少量 DTT，有轻微刺激性气味，但不含剧毒的巯基乙醇。

11. 抽提得到的胞浆蛋白和核蛋白可以使用 BCA 法测定蛋白浓度（推荐使用 BCA

蛋白浓度检测试剂盒，不适用 Bradford 法测蛋白浓度。

12. 本试剂盒中试剂都应在室温下溶解，请勿加热。

13. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴好一次性手套操作。