

## 酵母核蛋白提取试剂盒

货号: EX2220

规格: 50T/100T

有效期: 2-8°C保存, 有效期一年。

### 产品内容:

名称	50T	100T	储存条件
酵母核蛋白提取液 A	20ml	40ml	2-8°C保存
酵母核蛋白提取液 B	25ml	50ml	2-8°C保存
酵母核蛋白提取液 C	20ml	40ml	2-8°C保存
酵母核蛋白提取液 D	15ml	30ml	2-8°C保存
蛋白酶抑制剂混合物	100ul	200ul	-20°C保存

### 注:

1. 蛋白酶抑制剂未开盖使用前也可以2-8°C储存。开盖使用后-20°C储存。
2. 蛋白酶抑制剂在2-8°C低温时是固体状态, 从冰箱取出后恢复至室温或37°C短时间水浴, 变成液体状态后离心至管底部再开盖。
3. 试剂拆封后请尽快使用完!

### 产品简介:

酵母核蛋白提取试剂盒提供全套试剂, 适用于从各种酵母中提取核蛋白。提取过程简单方便。制备的核蛋白纯度高, 保持天然活性, 绝少交叉污染。

本试剂盒含有的蛋白酶抑制剂混合物, 阻止了蛋白酶对蛋白的降解, 为提取高纯度的蛋白提供了保证。

本试剂盒提取的蛋白可用于 Western Blotting、蛋白质电泳、免疫沉淀、ELISA、转录活性分析、Gel shift 凝胶阻滞实验、酶活性测定等下游蛋白研究实验。

本试剂盒提取的蛋白为具有天然蛋白构象的活性蛋白。

本试剂盒中不含有 EDTA, 与金属螯和层析等下游应用兼容。

### 自备试剂和仪器:

离心机、振荡器、涡旋混匀器、移液器、冰箱、冰盒, PBS缓冲液、蛋白定量试剂盒, 离心管、吸头、一次性手套

### 产品特点:

- 1、使用方便, 从细胞, 组织中提取蛋白不需经过研磨、反复冻融、超声破碎等前处理。
- 2、将蛋白提取的时间缩短至 30 分钟-1 小时。
- 3、含蛋白稳定剂, 提取的蛋白稳定。
- 4、紫外检测蛋白浓度时, 背景干扰低。
- 5、蛋白提取液含多种有效成分, 可以充分释放胞浆蛋白、核蛋白, 又可结合释出的蛋白防止沉淀。

6、蛋白酶抑制剂抑制了蛋白的降解，蛋白酶抑制剂配方优化。蛋白酶抑制剂混合物包含 6 种独立的蛋白酶抑制剂 AEBSF、Aprotinin、Leupeptin、Pepstatin A、Bestatin、E-64，每一种抑制剂可特异性抑制某一种或几种蛋白酶活性。该混合物优化的组成使其可以抑制几乎所有重要的蛋白酶活性，包括丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、丙氨酰-氨基肽酶等。

## 使用方法：

### 一、使用注意事项：

- 1、旋帽离心管装的试剂在开盖前请短暂离心，将盖内壁上的液体甩至管底，避免开盖时液体洒落。
- 2、实验过程中的所有试剂须预冷；所有器具须放-20℃冰箱预冷。整个过程须保持样品处于低温。
- 3、蛋白酶抑制剂储存期间溶液如果出现沉淀，不影响使用，溶解后正常使用。
- 4、如果试剂盒不能短时间内用完，蛋白酶抑制剂混合物不可以一次全部加入提取液。
- 5、可以根据自己实验需要加入其它蛋白酶抑制剂单品。
- 6、蛋白酶抑制剂在 2-8℃时是固体状态，从冰箱取出后恢复至室温或 37℃短时间水浴，变成液体状态后离心 至管底部再开盖。

### 二、操作步骤

#### 1. 提取液准备：

每200ul蛋白提取液D中分别加入2ul蛋白酶抑制剂混合物，混匀后置冰上备用。

2. 酵母培养物，在4℃，1000×g条件下离心5-10分钟，小心吸取培养基，尽可能吸干，收集酵母沉淀。
3. 用PBS洗涤酵母两次，每次洗涤后尽可能吸干上清。
4. 每100ul体积酵母沉淀物中加入200ul酵母核蛋白提取液A，混匀后，在30℃条件下保温 15分钟。
5. 在1000×g条件下离心5-10分钟，弃上清，收集酵母沉淀。
6. 用500ul PBS洗涤酵母一次，离心收集菌体。
7. 酵母沉淀物中加入300-500ul酵母蛋白提取液B，充分混匀。
8. 在37℃或室温条件下轻微振荡45-60分钟。
9. 在1000×g条件下离心5-10分钟，收集沉淀，弃上清。
10. 用500ul PBS洗涤沉淀。离心收集沉淀。
11. 沉淀中加入400ul酵母核提取液C，高速涡旋15秒混匀，然后在振荡器上振荡15-30分钟。
12. 再次高速涡旋振荡5秒，然后在4℃，2000×g条件下离心5分钟，弃上清，留沉淀。
13. 在沉淀中加入200ul冷的核蛋白提取液D，充分混匀。
14. 置振荡器上振荡30-40分钟。
15. 在4℃，12000×g条件下离心10分钟。
16. 将上清吸入另一预冷的干净离心管，即可得到酵母核蛋白。
17. 将上述蛋白提取物定量后分装于-80℃冰箱保存备用或直接用于下游实验。

### 常见问题分析：

#### 1. 蛋白浓度低？

处理部分酵母样本时可能没有裂解完全，导致蛋白浓度低。只要适当延长试剂 BC 的处理时间即可。最好在持续振荡的条件下处理，没有振荡器也可间隔几分钟用吸头吹打混匀。

酵母核蛋白丰度较低，在条件允许的情况下，加大酵母的上样量。

## 2. 用什么方法定量蛋白?

建议用 BCA 法。不适合用 Bradford 法，因为试剂 A 中含有干扰 Bradford 法的组份，导致定量不准。如果已经进行过透析处理或者用脱盐柱更换过缓冲体系，则可以用 Bradford 法定量。

## 3. 提取的蛋白具有活性吗?

本试剂盒不含有离子型去垢剂组份，不破坏蛋白的结构，没有对蛋白质之间原有的相互作用的破坏，蛋白均保持其天然构象和活性。

## 4. 提取时出现胶状沉淀?

蛋白提取液处理产物中有时会出现少量透明胶状物，属正常现象。该透明胶状物为含有基因组 DNA 等的复合物。不检测和基因组 DNA 结合特别紧密的特定蛋白的情况下，可以直接离心取上清进行后续实验即可；如果需要检测和基因组结合特别紧密的蛋白，则可以通过超声处理，300w/10 秒间隔 10 秒，超声 3 分钟，随后离心取上清用于后续实验。

### **注意事项：**

1. 正式实验前请选取几个样本做预实验，以优化实验条件，取得最佳实验效果。
2. 螺旋盖微量试剂管装的试剂在开盖前请短暂离心，将盖和管内壁上的液体离心至管底，避免开盖时试剂损失。
3. 禁止与其他品牌的试剂混用，否则会影响使用效果。
4. 样品或试剂被细菌或真菌污染或试剂交叉污染可能会导致错误的结果。
5. 最好使用一次性吸头、管、瓶或玻璃器皿，可重复使用的玻璃器皿必须在使用前清洗并彻底清除残留清洁剂。
6. 实验后完成后所有样品及接触过的器皿应按照规定程序处理。