



## 核蛋白提取试剂盒（蛋白组实验、质谱适用）

货号：EX2550

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
组分 A：核蛋白提取液 A	30ml	60ml	2-8°C保存
组分 B1：蛋白提取液 B1	12.5ml	25ml	2-8°C保存
组分 B2：蛋白提取液 B2	2.5ml	5ml	2-8°C保存
组分 C：蛋白酶抑制剂混合物	250ul	500ul	-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：

核蛋白提取试剂盒提供全套试剂，适用于从各种原代或传代动物细胞和各种动物实体组织，如脑、脊髓、神经结或纤维、脂肪、肝脏、消化道、肾脏、心脏、肌肉、血管、结缔组织等动物组织中提取核蛋白和胞浆蛋白。提取过程简单方便，可在1小时内完成。制备的核蛋白和胞浆蛋白不仅纯度高，保持天然活性，而且绝少交叉污染。

本试剂盒含有的独特配方能够有效溶解细胞核膜组份。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。

本试剂盒的蛋白提取组份中不含有不可透析除去的去垢剂组份，不含 SDS、Triton X100、chaps 等可能影响质谱实验的组份，最后得到的蛋白质样品经过透析或者脱盐处理后将不含有去垢剂、高浓度盐等影响，基本可以满足下游任意的蛋白质组学相关实验研究。

本产品的蛋白酶抑制剂混合物中不含 AEBSF，可以避免由于 AEBSF 导致的质谱峰漂移，因此使用本产品提取的蛋白样品可以用于质谱(Mass Spectrometry, MS)检测和分析，蛋白质组学(proteomics)等相关研究。

### 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、总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 5 种独立的蛋白酶抑制剂 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. 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。
7. 实验过程中的所有试剂须预冷;所有器具须放-20°C冰箱预冷。整个过程须保持样品处于低温。
8. 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
9. 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。

### 二、蛋白提取

#### 1. 提取液制备:

将试剂 B1 和试剂 B2 混合,配成蛋白提取液 B,充分混匀备用。

每500 $\mu$ l蛋白提取液 B 中加入 2 $\mu$ l 蛋白酶抑制剂混合物,混匀后置冰上备用。

2. 取 $5 \times 10^6$  -  $1 \times 10^7$ 个细胞(大约50 mg细胞/50 $\mu$ l 细胞),在4°C, 500 $\times$ g 条件下离心 5 分钟,小心吸取培养基,尽可能吸干,收集细胞。
3. 用冷PBS洗涤细胞两次,每次洗涤后尽可能吸干上清。
4. 大约每20 $\mu$ l细胞(离心后细胞沉淀体积)中加入200-300 $\mu$ l 冷的提取液A,高速涡旋振荡混匀或吹打混匀,置2-8°C条件振荡10-30分钟。
5. 然后在4°C, 2000 $\times$ g条件下离心 10 分钟。弃上清,收集沉淀。
6. 在沉淀中加入100-200 $\mu$ l冷的提取液B,高速涡旋振荡15秒。
7. 置2-8°C条件振荡30-40分钟。
8. 在4°C, 12000 $\times$ g 条件下离心10分钟。
9. 将上清吸入另一预冷的干净离心管,即可得到核蛋白。
10. 将上述蛋白提取物定量后分装于-80°C冰箱保存备用或直接用于下游实验。
11. 将蛋白样品透析处理或者脱盐柱脱盐处理后用于下游实验。

### 常见问题分析：

#### 1. 蛋白浓度低？

核蛋白丰度较低，需要足够细胞数量提取，在条件允许的情况下，尽可能加大细胞量。

注意用蛋白提取液B处理时没有裂解完全，导致蛋白浓度低。只要适当延长试剂 B 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，至无明显沉淀。

如果需要检测和基因组结合特别紧密的蛋白，则需要采用超声处理。

#### 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改换过缓冲体系，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。

### 注意事项：

1. 本试剂盒仅供科学研究使用，不可用于诊断或治疗。
2. 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。
3. 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。
4. 避免皮肤或粘膜与试剂接触。
5. 如果试剂不小心接触皮肤或眼睛，应立即用水冲洗。