

## 细胞膜/胞浆/核蛋白分步提取试剂盒

货号：EX1420

规格：50T/100T

有效期：2-8℃保存，有效期 1 年。

### 产品内容：

| 名称             | 50T   | 100T   | 储存条件   |
|----------------|-------|--------|--------|
| 组分 A：提取液 A     | 20ml  | 40ml   | 2-8℃保存 |
| 组分 B：核提取液 B    | 10ml  | 20ml   | 2-8℃保存 |
| 组分 C：提取液 C     | 500μl | 1000μl | 2-8℃保存 |
| 组分 D：提取液 D     | 10ml  | 20ml   | 2-8℃保存 |
| 组分 E：蛋白酶抑制剂混合物 | 250μl | 500μl  | -20℃保存 |
| 组分 F：磷酸酶抑制剂混合物 | 250μl | 500μl  | 2-8℃保存 |
| 组分 G：针筒        | 1     | 1      | 室温保存   |

### 注：

1. 蛋白酶抑制剂未开盖使用前也可以2-8℃储存。开盖使用后-20℃储存。
2. 蛋白酶抑制剂在2-8℃低温时是固体状态，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。
3. 试剂拆封后请尽快使用完！

### 产品简介：

细胞膜/胞浆/核蛋白分步提取试剂盒适用于从各种原代或传代细胞中分步提取膜蛋白/胞浆蛋白/核蛋白。提取过程简单方便，可在1小时内完成。

本试剂盒含有的独特配方能够有效溶解细胞膜组份，包括细胞质膜、核膜和各种细胞器膜。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。

本试剂盒提取的蛋白样本含有高浓度的盐成分，不可直接用于2D电泳，如下游实验需要直接用于等电聚焦、双向电泳，可以将最后样品除盐后再用于2D电泳，用脱盐柱脱盐处理。

### 自备试剂和仪器：

离心机、振荡器、匀浆机/匀浆器、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 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，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. 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。
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. 可以根据自己实验需要加入其它蛋白酶抑制剂单品。

### 二、操作步骤

#### 1. 提取液准备：

每400μl冷的蛋白提取液A/B/D中都分别加入2μl蛋白酶抑制剂混合物和2μl磷酸酶抑制剂混合物，混匀后置冰上备用。

#### 注：

(1)根据需要处理的样品数量准备蛋白提取液，蛋白酶抑制剂混合物不可以一次全部加入提取液。

(2)加过蛋白酶抑制剂的提取液一周内未使用完，再次使用前需要再次加入蛋白酶抑制剂。

(3)蛋白样品用于测定某些细胞内蛋白酶、磷酸酶活性等下游实验时，注意根据实际情况调整抑制剂混合物是否加入。

2. 取5-10×10<sup>6</sup>个细胞，在4℃，800×g条件下离心5-10分钟，小心吸取培养基，尽可能吸干。

#### 注：

贴壁培养细胞用细胞刮刀收集细胞或胰酶消化下来均可。

3. 用冷PBS洗涤细胞两次，每次洗涤后尽可能吸干上清。

4. 每5×10<sup>6</sup>个细胞中加入400μl冷的蛋白提取液A，混匀后，在4℃条件下用试剂盒所配针筒反复吸吹细胞，使细胞完全破裂。

#### 注：

(1)一般反复抽吸至轻微起泡即可。

(2)可以使用其它针筒，但是必须使用试剂盒所配的针头处理细胞。

(3)可以吸取少量液体进行镜检。

5. 在4℃，1000×g条件下离心5分钟。

6. 将上清(I)吸入另一干净离心管，在沉淀中加入100-200μl冷的提取液B，高速涡旋振荡15秒，充分混匀。

注：上清(I)置4℃保存备用。

7. 将混匀的提取液B置4℃低速振荡30-40分钟。

#### 注：

(1)使用振荡器较低转速，保持提取液能稍微晃动即可。

(2)没有振荡条件可以不振荡，置2-8℃静置，稍微延长处理时间，中间每隔10分钟用移液器吹打混匀。

8. 在4℃，12000×g条件下离心10分钟。将上清吸入另一预冷的干净离心管，即可得到核蛋白。

9. 在步骤6中所得到的上清(I)中加入8μl提取液C，充分混匀。



**注:**

(1)添加试剂C时注意有效的加入,由于试剂C比较粘稠,可能会吸附在吸头,没有添加进去,气温较低时可以把吸头和试剂C在37°C预热一下。

(2)添加时不要将吸头伸入到冷的试剂A中,会导致试剂C凝固而出不来,在接近液面的地方沿着离心管壁加入,注意观察是否有效加入。

(3)加入后充分混匀。

(4)上清(I)须一直置4°C条件。

10. 在2-8°C振荡20-30分钟。

**注:**

(1)此步骤必须在2-8°C条件振荡。

(2)使用较低转速保持提取液稍微晃动即可。

(3)没有振荡条件可以不振荡,置2-8°C静置,稍微延长处理时间,中间每隔几分钟用移液器吹打混匀。

11. 在37°C水浴10分钟。

12. 在37°C下1000g离心3分钟,此时溶液分为两层,上层是胞浆蛋白部分,下层部分(II)是膜蛋白约为40-50μl。

**注:**

(1)此步骤必须在37°C条件下离心。

(2)没有37°C离心条件也可不离心,稍微延长37°C水浴时间,至溶液变澄清,分层明显即可。

13. 将上层小心吸入另一预冷的干净离心管,即可得到胞浆蛋白。

14. 用50-100 μl冰冷的提取液D溶解步骤12中的下层部分(II),即得膜蛋白。

**注:**

(1)膜蛋白比较难溶解,不能很快溶解混匀,可以在加入溶解液后稍微吹打混匀,然后置于4°C冰箱静置至溶解。中途用移液器轻轻吹打混匀一次。静置后取出再次用移液器稍微吹打混匀即可。

(2)于4°C静置直至管底透明胶状物完全溶解。

15. 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。

**注:**

(1)建议用BCA法进行蛋白定量。

(2)蛋白样品 -80°C存放一年没有问题。注意不要被蛋白酶水解掉,不要被细菌污染。

**常见问题分析:**

1. 蛋白浓度低?

处理部分样本时可能没有裂解完全,导致核蛋白/膜蛋白浓度低。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。

膜蛋白丰度较低,在条件允许的情况下,需要尽可能加大细胞的上样量。

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改换过缓冲体系,则可以用Bradford法定量。

3. 提取时出现胶状沉淀?





核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。检测一些常见的转录因子，例如 NF-kappaB、p53 等时，不必进行超声处理。

#### 4. 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。

#### 5. 膜蛋白电泳没有条带？

膜蛋白样品通常浓度较低，电泳前一定要进行蛋白定量，以保证电泳是蛋白上样量足够。

膜蛋白提取好后，用溶解液充分溶解后，可以超声处理一下，再进行蛋白定量。

蛋白加 Loading buffer 后可以不用煮沸，采用 50℃保温 30 分钟。

蛋白 Loading buffer 中 SDS 终浓度含量可以提高至 3%-10%。

有些样品的膜蛋白含量太低，可以使用丙酮沉淀膜蛋白，再使膜蛋白溶解于上样缓冲液中，一般可以跑出清晰的蛋白条带。

电泳时最好采用低电压低电流电泳。

膜蛋白丰度通常较低，有条件可以尝试用银染染色。

### 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。

