For Research Use Only

核蛋白与胞浆蛋白抽提试剂盒

Catalog Number: PK10014

proteintech®

www.ptgcn.com

产品介绍

Proteintech研发的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。

关于试剂盒

●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。

●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。

●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。

●建议样品不少于2000万个细胞或100mg组织， 当样品的数量为2000万个细胞或100mg组织时，本试剂盒可以处理30个样品。

产品成分

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

包装规格

30T

保存条件

-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 uL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 uL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。

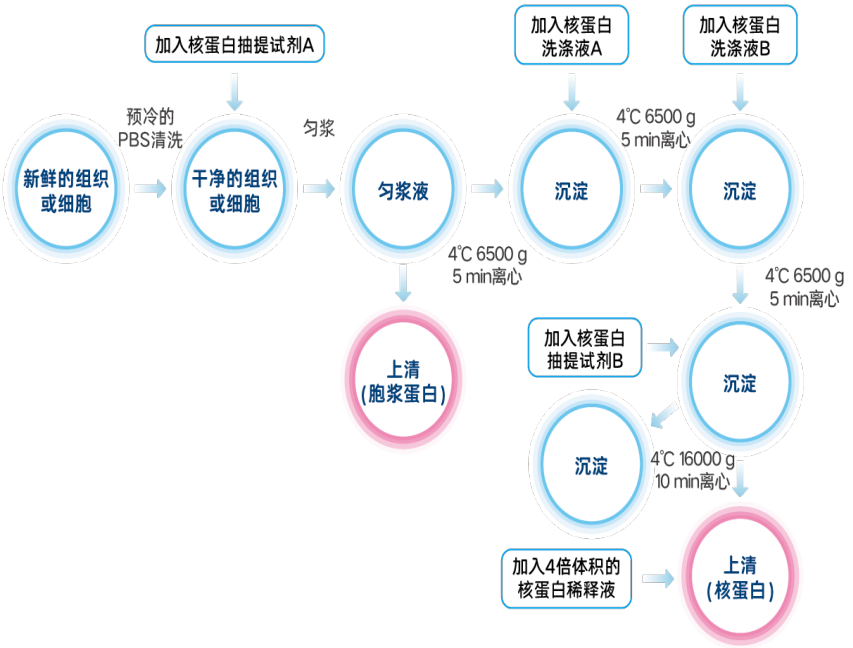
注意

1、所有步骤都需在低温下进行。
2、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。
3、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。
4、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（货号：PR20032）。用于磷酸化抗体检测还需提前加入磷酸酶抑制剂混合物（货号：PR20015）。
5、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（货号：PR20016）。
6、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。
7、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Proteintech BCA蛋白浓度检测试剂盒（货号：PK10026）），不适用Bradford法测蛋白浓度。
8、本试剂盒中试剂都应在室温下溶解，请勿加热。
9、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴好一次性手套操作。

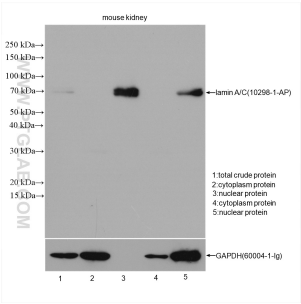
问题检测

问题	可能原因	解决方案
未得到核蛋白	样品破碎过度，导致细胞核破碎	减少匀浆、涡旋、冻融次数
	样品量太少	增加提取的样品量
核蛋白中含有胞浆蛋白	样品破碎程度不够，导致有部分未破碎的细胞到达了核蛋白抽提步骤中	增加匀浆、涡旋、冻融次数
	清洗不彻底	延长清洗时间
	洗涤液A和B使用顺序颠倒	按说明书规范操作
胞浆蛋白中有核蛋白	样品破碎过度，导致细胞核破碎	减少匀浆、涡旋、冻融次数

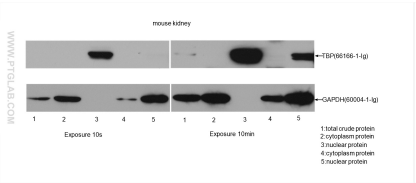
提取流程



Validation Data



上样量：30 μg； 抗体：Lamin A/C
货号：10298-1-AP 稀释度：1 : 6000
曝光时间：10 s
Lane 1：总蛋白
Lane 2-3：使用Proteintech 细胞核蛋白与胞浆蛋白抽提试剂盒提取的核蛋白与胞浆蛋白检测
Lane 4-5：使用其他公司产品提取的核蛋白与胞浆蛋白检测



上样量：30 μg； 抗体：TBP
货号：66166-1-Ig 稀释度：1 : 6000
曝光时间：10 s；10 min
Lane 1: 总蛋白
Lane 2-3: 使用Proteintech 细胞核蛋白与胞浆蛋白抽提试剂盒提取的核蛋白与胞浆蛋白检测
Lane 4-5: 使用其他公司产品提取的核蛋白与胞浆蛋白检测