

核膜蛋白和核内蛋白提取试剂盒

产品货号：26165

产品规格：50T/100T

产品简介：

核膜蛋白与核内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膜蛋白和核内蛋白，包括组蛋白核非组蛋白。提取过程简单方便，可在1小时内完成。制备的核膜蛋白和核内蛋白不仅纯度高，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。

本试剂盒提取的蛋白可用于Western Blotting、转录活性分析、Gel shift凝胶阻滞实验、免疫共沉淀、酶活性测定等蛋白研究。

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为具有天然蛋白构象的活性蛋白。

本试剂盒提取的蛋白含高浓度盐，不可直接用于2D电泳，需要透析、脱盐后在用于2D电泳。如下游实验需要直接用于2D电泳，请使用尚宝其他货号的试剂盒。

产品组成：

产品名称	50T	100T	保存条件
试剂(A)：核提取液A	30ml	60ml	2-8℃
试剂(B)：膜提取液B	10ml	20ml	2-8℃
试剂(C)：膜蛋白溶解液C	10ml	20ml	2-8℃
试剂(D)：蛋白酶抑制剂混合物	250 μl	500 μl	-20℃
试剂(E)：磷酸酶抑制剂混合物	250 μl	500 μl	2-8℃

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，从冰箱取出后恢复室温或37℃短时间水浴，变成液体状态后离心至底部再开盖。
3. 试剂拆封后请尽快使用完！

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. 含蛋白稳定剂，提取的蛋白稳定。
3. 紫外检测蛋白浓度时，背景干扰低。
4. 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。
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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

试剂盒以外自备试剂耗材和仪器:

PBS、蛋白定量试剂盒、吸头、离心管、移液器、冰盒、离心机、涡旋振荡器、冰箱。

使用方法:

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. Western实验内参可以选用Lamin A、Lamin B、TBP、Histon H3。
7. 提取液B在使用前一直置于2-8℃条件，否则下游膜蛋白提取时不容易分层。
8. 膜蛋白电泳时Loading Buffer应注意避免煮沸。
9. 膜蛋白电泳时可以提高Loading Buffer的SDS含量。

细胞蛋白提取

1. 提取液制备:

每300ul冷的蛋白提取液B中加入1ul蛋白酶抑制剂混合物和1ul磷酸酶抑制剂，混匀后置冰上备用。

每300ul冷的膜蛋白溶解液C中加入1ul蛋白酶抑制剂混合物和1ul磷酸酶抑制剂，混匀后置冰上备用。

【注】:

- 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。磷酸酶抑制剂可以一次加入。
 - 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。
 - 以下步骤中使用的蛋白提取液为此步配制好的含蛋白酶抑制剂的提取液。
2. 取5-10×10⁶个细胞，在4℃，500×g力条件下离心2-3分钟，小心吸取培养基，尽可能吸干，收集细胞。

【注】:

- 细胞数量根据实验情况调整。由于核膜蛋白含量极少，需要较多的细胞才能保证得率。在条件允许的情况下，取尽可能多的细胞样品。
3. 用冷PBS洗涤细胞两次，每次洗涤后尽可能吸干上清。
 4. 每20ul体积细胞沉淀（约20mg，2×10⁶个细胞）中加入100-200ul冷的提取液A，高速涡旋混匀或吹打混匀，置2-8℃条件振荡15-30分钟。
 5. 再次高速涡旋振荡混匀，然后在4℃，10000×g条件下离心5分钟。
 6. 弃上清，收集沉淀。
 7. 沉淀用PBS洗涤一次，然后在4℃，10000×g条件下离心5分钟，弃上清。
 8. 在沉淀中加入100-200ul冷的提取液B，高速涡旋混匀15秒。置2-8℃条件振荡30分钟-2小时。

【注】:

- 提取液B处理后沉淀体积应明显减少，否则延长提取液B振荡处理时间。
 - 蛋白提取液B处理后产物中有时会出现少量透明胶状物，属正常现象。可以通过超声处理除去，300w/10秒间隔10秒，超声3分钟。
9. 置37℃水浴10分钟。然后在37℃ 500-1000×g力离心2分钟。

【注】:

- 必须37℃水浴和离心。
- 没有37℃离心条件可以不离心，延长水浴时间至分层明显即可。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

10. 此时溶液分为两层，小心移除上层，即为核内蛋白。

11. 留下管底部下层大约20-30ul液体。

【注】：

- 下层为粘稠状液体。

12. 用30-100ul膜蛋白溶解液C溶解该溶液，即得核膜蛋白样品。

【注】：

- 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℃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。
- 静置直至管底透明胶状物完全溶解。

13. 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。

【注】：

- 建议用BCA法进行蛋白定量。
- 蛋白样品-80℃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。

组织蛋白提取

1. 提取液制备：

每300ul冷的蛋白提取液B中加入1ul蛋白酶抑制剂混合物和1ul磷酸酶抑制剂。混匀后置冰上备用。

每300ul冷的膜蛋白溶解液C中加入1ul蛋白酶抑制剂混合物和1ul磷酸酶抑制剂，混匀后置冰上备用。

【注】：

- 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。磷酸酶抑制剂可以一次加入。
 - 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。
2. 取适量组织样本用剪刀剪碎，加冷PBS，用组织匀浆器匀浆至无明显肉眼可见固体。
 3. 匀浆液在4℃，500×g力条件下离心2-3分钟，弃上清。
 4. 每20ul体积细胞沉淀（约20mg，2×10⁶个细胞）中加入100-200ul冷的提取液A，高速涡旋混匀或吹打混匀，置2-8℃条件振荡15-30分钟。
 5. 再次高速涡旋振荡混匀，然后在4℃，10000×g条件下离心5分钟。
 6. 弃上清，收集沉淀。
 7. 沉淀用PBS洗涤一次，然后在4℃，10000g条件下离心5分钟，弃上清。
 8. 在沉淀中加入100-200ul冷的提取液B，高速涡旋混匀15秒。置2-8℃条件振荡30分钟-2小时。

【注】：

- 提取液B处理后沉淀体积应明显减少，否则延长提取液B振荡处理时间。
 - 蛋白提取液B处理后产物中有时会出现少量透明胶状物，属正常现象。可以通过超声处理，300w/10秒间隔10秒，超声3分钟。
9. 置37℃水浴10分钟。然后在37℃ 500-1000×g力离心2分钟。

【注】：

- 必须37℃水浴和离心。
 - 没有37℃离心条件可以不离心，延长水浴时间至分层明显即可。
10. 此时溶液分为两层，小心移除上层，即为核内蛋白。

11. 留下管底部下层大约20-30ul液体。

【注】：

- 下层为粘稠状液体。

12. 用30-100ul膜蛋白溶解液C溶解该溶液，即得核膜蛋白样品。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

【注】：

- 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℃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。
 - 静置直至管底透明胶状物完全溶解。
13. 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。

【注】：

- 建议用BCA法进行蛋白定量。
- 蛋白样品-80℃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。

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。

效期：12个月。

常见问题分析：**1. 核蛋白浓度低？**

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。

4. 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。

电泳时最后采用低电压低电流电泳。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com