ExKine™ 核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒

Cat #: KTP3001 Size: 50 T/200 T

	核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒		
REF	**货号：**KTP3001	LOT	**批号：**见产品标签
	适用样本：动物组织、细胞		
	保质期：-20℃保存 12 个月		

原理

分离细胞核蛋白和胞浆蛋白，不仅可以用于研究蛋白在细胞内的定位，而且很多时候分离出来的蛋白可以用于转录调控方面的研究，例如 WB，EMSA（也称 gel shift），footprinting，报告基因，酶活性分析等。ExKine™ 核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒适合从新鲜的哺乳动物组织和培养细胞中提取蛋白，提取的蛋白纯度高且保持天然活性，绝少交叉污染。通过胞浆蛋白抽提试剂，在低渗透压条件下，使细胞充分膨胀，然后破坏细胞膜，释放出胞浆蛋白；然后通过离心得到细胞核沉淀，最后通过高盐的细胞核蛋白抽提试剂抽提得到细胞核蛋白。不到两小时就能纯化出非变性的活性蛋白质。

包装清单

试剂盒组分	规格		储存条件
	50 T	200 T	
Cytoplasmic Solution A (CESA)	10 mL	40 mL	4℃
Cytoplasmic Solution B (CESB)	0.5 mL	2 mL	4℃
Nuclear Extraction Solution (NES)	5 mL	20 mL	4℃
DTT(500×)	40 µL	130 µL	-20℃
Protease Inhibitor (100×)	0.2 mL	0.7 mL	-20℃

自备耗材

- 涡旋仪、离心管
- 细胞刮刀
- 可调节式移液枪及枪头
- 磷酸盐缓冲液(PBS)
- 匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.

Working Cytoplasmic Solution A (Working CESA)：使用前，立即加入 10 μL Protease Inhibitor (100×)和 2 μL DTT(500×)到 1 mL CESA 中，置于冰上；4℃保存。

Cytoplasmic Solution B (CESB)：即用型；使用前，置于冰上；4℃保存。

Working Nuclear Extraction Solution (Working NES)：使用前，立即加入 10 μL Protease Inhibitor (100×)和 2 μL DTT (500×)到 1 mL NES 中，置于冰上；4℃保存。

DTT (500×)：即用型；使用前，置于冰上；-20℃保存。用不完的试剂-20℃分装保存，避免反复冻融。

Protease Inhibitor (100×)：即用型；使用前，置于冰上；-20℃保存。用不完的试剂-20℃分装保存，避免反复冻融。

实验步骤

注意：所有的实验步骤需在 2-8℃进行。使用预冷的缓冲液和设备。确保所有的溶液是解冻和均匀的。

I 细胞培养物的制备

1. 对于贴壁细胞，用细胞刮刀收获 2×10^6 个细胞，然后 500 g 离心 5 min。对于悬浮细胞，500 g 离心 5 min。
2. 用预冷的 PBS 重悬细胞沉淀，500 g 离心 2-3 min，弃上清。

注意：使用移液器小心吸取上清，使细胞沉淀尽可能干燥。

3. 向细胞沉淀中加入 200 μL 预冷的 Working CESA 后，继续步骤 III。

II 组织制备

1. 将 30-60 mg 组织切成小块，放入离心管中。
2. 用预冷的 PBS 清洗组织，500 g 离心 5 min，弃上清。

注意：使用移液器小心吸取上清，使细胞组织尽可能干燥。

3. 用 200 μL 预冷的 Working CESA 重悬组织。
4. 使用匀浆器匀浆组织，直至超过 90%的细胞被破坏，细胞核在显微镜下可见，继续步骤 III。

III 胞浆蛋白和核蛋白提取

1. 用涡旋仪（最高设置）剧烈涡旋样本管 5 s，使细胞完全悬浮。离心管在冰上孵育 15 min，使细胞膨胀。
2. 加入 10 μL 冰冷的 CESB 到离心管中，设置最高时速，涡旋 5 s，在冰上孵育 1-2 min。
3. 16,000 g，4℃离心 5 min。
4. 立即将上清液（胞浆蛋白提取物）转移到干净的预冷离心管中，置于冰上待测或在-80℃下长期保存。沉淀（含有细胞核）通常是粘性的并且是非常紧凑。

可选步骤：为了从细胞核中去除残留的胞浆蛋白，用额外的预冷 Working CESA 或 PBS 重悬沉淀，然后重复步骤 III 的 3 和 4 步骤 1-2 遍。

5. 加入 100 μL 预冷的 Working NES 重悬沉淀后，置于冰上，每隔 3-5 min 涡旋 15 s，持续 30 min。避免泡沫形成。

注意：如果沉淀有分散不开的情况，可剪断吸头后用吸头反复吹打。

6. 16,000 g，4℃离心 15 min。
7. 分装上清液（核蛋白）到预冷的离心管，取出一小份用于蛋白定量检测。将其它装有核蛋白的离心管保存在-80℃。避免反复冻融。

注意：根据该实验步骤提取的核蛋白中含 NES（一种高盐缓冲液）。如果在随后的应用中需要大量的核提取物或者如果下游检测出现问题，可透析核蛋白以除去高盐物质。

注意事项

问题	可能的原因	解决办法
胞浆蛋白浓度低	裂解或提取缓冲液的体积和细胞数量不匹配	进行细胞计数，并使用合适体积的缓冲液
	细胞沉淀未分散	充分涡旋
	细胞未裂解	增加 CESB 用量

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.

	组织使用 PBS 匀浆	用 Working CESA 匀浆组织
核蛋白浓度低	细胞沉淀未分散	充分涡旋
	细胞核分离不完全	加入 CESB 后，增加离心时间
	使用自己配制的裂解或提取缓冲液	使用该试剂盒中提供的裂解或提取缓冲液
胞浆蛋白和核蛋白未完全分离	细胞裂解不充分	增加涡旋时间，以充分分散细胞沉淀
		增加 CESB 用量
	胞浆蛋白未完全移除	在细胞核裂解之前，小心操作，移除胞浆蛋白
		用额外的 Working CESA 或 PBS，重悬细胞核

相关产品

Catalog No.	Product Name
KTP3002	ExKine™ 核蛋白提取试剂盒
KTP3003	ExKine™ 胞浆蛋白提取试剂盒
KTP3004	ExKine™ 总膜蛋白提取试剂盒
KTP3005	ExKine™ 膜蛋白与胞浆蛋白提取试剂盒
KTP3006	ExKine™ 总蛋白提取试剂盒

免责声明

本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.