



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

http:// [www.real-tims.com.cn](http://www.real-tims.com.cn)

E-mail: [real-times@vip.163.com](mailto:real-times@vip.163.com)

## 动物核蛋白与胞浆蛋白提取试剂盒

### Animal Nuclear and Cytoplasmic Protein Extraction Kit

Ver 20260127-2.0

产品货号	名称	规格
RTD8303	动物核蛋白与胞浆蛋白提取试剂盒	50 次

#### ● 产品简介:

在研究细胞时经常要研究细胞的不同组份，而研究得最多的两个细胞组份就是细胞核和胞浆。分离核蛋白和胞浆蛋白，不仅可以用于研究蛋白在细胞内的定位，而且可以用于转录调控方面的研究，例如 EMSA(也称 gel shift), footprinting 等。动物核蛋白与胞浆蛋白提取试剂盒提供了一种比较简单方便地从组织和培养细胞中抽提细胞核蛋白与胞浆蛋白的方法。约 90 分钟就可以完成细胞核蛋白与胞浆蛋白的分离。抽提得到的蛋白可以用于 Western, EMSA, footprinting, 报告基因检测以及酶活力测定等实验。

本试剂盒是通过抽提试剂 A 与抽提试剂 B 协同作用，破坏细胞膜，释放出胞浆蛋白，然后通过离心得到细胞核；再用高盐的细胞核蛋白抽提试剂抽提得到核蛋白。一般情况下，胞浆蛋白与核蛋白之间的交叉污染低于 10%。提取得到的胞浆蛋白含有非离子去垢剂，保持了蛋白活性；提取得到的核蛋白为可溶性核蛋白（不包括核膜蛋白和核骨架蛋白），不含去垢剂，由于盐离子浓度较高，可能需要脱盐或稀释后用于相关实验。

对于细胞样品，如果细胞数量在二百万 ( $2 \times 10^6$ )，本试剂盒可以抽提 50 个样品；对于组织样品，如果每个样品重量为 20 毫克，本试剂盒可以抽提 50 个样品。

#### ● 产品组成:

产品编号	名称	规格	贮存
RTD8303-01	细胞浆蛋白抽提试剂 A	20 ml	-20°C
RTD8303-02	细胞浆蛋白抽提试剂 B	0.5 ml	-20°C
RTD8303-03	细胞核蛋白抽提试剂	5 ml	-20°C

#### ● 贮存、效期及运输:

-20°C 贮存；有效期一年；试剂盒湿冰运输。

#### ● 用前必读:

1. 离心机请调整成 RCF/g 模式，按照离心力设置离心机（不要根据转速 rpm 模式设置），所有离心步骤都需要在 4°C 低温离心机中进行。
2. 蛋白提取推荐添加蛋白酶抑制剂如 100 mM PMSF (100×)（自备，试剂盒不提供），添加时按照 1:100 添加。研究蛋白磷酸化，需要添加磷酸酶抑制剂（自备，试剂盒不提供）。
3. 蛋白定量推荐使用 BCA 方法，可以选择 BCA 蛋白浓度测定试剂盒。

#### ● 使用方法:

## 一. 实验步骤:

1.1 准备溶液: 常温溶解试剂盒中的试剂, 溶解后立即放置在冰上, 混匀。取适当量的细胞浆蛋白抽提试剂 A 和细胞核蛋白抽提试剂, 在使用前加入 PMSF 溶液 (使得 PMSF 终浓度为 1 mM) 和/或磷酸酶抑制剂 (自备, 试剂盒不提供), 随后立即放于冰上待用。

### 1.2 准备细胞:

1.2.1 对于贴壁细胞: 用 PBS 漂洗一遍, 弃 PBS; 再加入适量 PBS, 用细胞刮刀刮下细胞, 或用 0.02% EDTA (0.5 mM) 溶液处理细胞使细胞不再贴壁很紧, 并用移液器吹打下细胞。450 g 4°C 离心 5 min 收集细胞, 尽最大努力吸尽上清, 留下细胞沉淀备用。尽量避免用胰酶消化细胞, 以免胰酶降解需抽提的目的蛋白。

1.2.2 对于悬浮细胞: 450 g 4°C 离心 5 min 收集细胞, 用 PBS 洗一遍, 离心收集细胞, 尽最大努力吸尽上清, 留下细胞沉淀备用。

### 1.3 按照下表大体估算提取溶液使用体积:

细胞类型	培养器皿	细胞数量	细胞沉淀体积 (PCV) (μl)	细胞浆蛋白抽提试剂 A (μl)
悬浮细胞		$2 \times 10^6$	~20	200
贴壁细胞	96 孔板	$\sim 1 \times 10^5$	调整细胞数目到 $2 \times 10^6$	
	24 孔板	$\sim 5 \times 10^5$	调整细胞数目到 $2 \times 10^6$	
	6 孔板	$\sim 2.5 \times 10^6$	调整细胞数目到 $2 \times 10^6$	
	25cm <sup>2</sup> 培养瓶	$\sim 2 \times 10^6$	~20	
	75cm <sup>2</sup> 培养瓶	$\sim 8 \times 10^6$	调整细胞数目到 $2 \times 10^6$	
	35 mm 培养皿	$\sim 2 \times 10^6$	~20	
	60 mm 培养皿	$\sim 5 \times 10^6$	调整细胞数目到 $2 \times 10^6$	
100 mm 培养皿	$\sim 1.5 \times 10^7$	调整细胞数目到 $2 \times 10^6$		

注: (二百万,  $2 \times 10^6$ ) HeLa 细胞, 其细胞沉淀体积 (PCV, Packed Cell Volume) 大约为 20 μl。

### 1.4 胞浆蛋白提取:

1.4.1 细胞沉淀中加入准备好的 200 μl 细胞浆蛋白抽提试剂 A (确保已添加蛋白酶抑制剂), 用 1 ml 吸头吹打重悬细胞沉淀 5-10 次, 把细胞沉淀完全悬浮并分散开, 冰浴 5 分钟。

1.4.2 关键步骤: 加入 10 μl 细胞浆蛋白抽提试剂 B (按照细胞浆蛋白抽提试剂 A 体积的 1/20 加入), 混匀, 冰浴 10 分钟。

注: 此步骤尽量不要漩涡震荡沉淀, 否则得到的细胞浆蛋白可能会污染核蛋白。

1.4.3 4°C 16000g 离心 5 分钟, 取 80% 上清即为胞浆蛋白, 保存备用。

注: 吸取上清时千万不要触及沉淀, 可以只取 80% 体积上清, 以免胞浆蛋白中污染细胞核。每  $2 \times 10^6$  细胞用 200 μl 细胞浆蛋白抽提试剂 A 裂解后获得的上清, 其细胞浆蛋白浓度约为 1-2 μg/μl, 不同细胞略有不同。

## 1.5 细胞核蛋白提取：

注：此步骤使用细胞核蛋白抽提试剂（高盐缓冲液）使得细胞核收缩，核酸结合蛋白（如转录因子）与核酸分离，扩散到细胞核外部，离心后上清中为可溶性非变性（活性）核蛋白，适用 EMSA，转录因子活性分析等实验。

1.5.1 彻底去除步骤 1.4.3 离心管内上清，沉淀中再次加入 200  $\mu$ l 细胞浆蛋白抽提试剂 A（含 PMSF），用 1 ml 吸头吹打重悬沉淀至沉淀完全散开（注：涡旋震荡不易悬浮沉淀），冰浴 5 分钟；4 $^{\circ}$ C 16000 g 离心 5 分钟，彻底去除上清，沉淀即为完整的细胞核。

注：此步骤目的是彻底漂洗沉淀中残余的未裂解细胞，可以大大提高细胞核的纯度；上清必须彻底去除干净，否则会导致细胞核蛋白中污染胞浆蛋白。

1.5.2 沉淀中加入 100  $\mu$ l 细胞核蛋白抽提试剂（确保已经添加 PMSF），吸头重悬沉淀，4 $^{\circ}$ C 旋转混匀 30 min，至最后得到的溶液无可见悬浮物。

注：如不能旋转混匀，可以冰浴 30 min，每隔 5 分钟涡旋混匀一次。

1.5.3 4 $^{\circ}$ C 16,000 g 离心 10 分钟，立即吸取上清至一预冷的离心管中，即为抽提得到的活性核蛋白。可以立即使用，也可以-80 $^{\circ}$ C 冻存。每  $2 \times 10^6$  细胞提取的细胞核蛋白浓度约为 1-3  $\mu$ g/ $\mu$ l（可以使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒定量），不同细胞略有不同。

## 1.6 对于新鲜组织：

### 1.6.1 组织匀浆（关键步骤）：

把组织尽可能切成非常细小的碎片。按照 20:1 的比例混合细胞浆蛋白抽提试剂 A 和 B（例如 200 微升细胞浆蛋白抽提试剂 A 中加入 10 微升细胞浆蛋白抽提试剂 B），并加入 PMSF 至终浓度为 1 mM 配制成组织匀浆液。按照每 20 mg 组织加入大约 200 微升组织匀浆液的比例在 1 ml 玻璃匀浆器内冰浴充分匀浆 5-10 次。鉴定方法：取 10  $\mu$ l 匀浆 5 次后的组织样品，加入等体积的台盼蓝染色液，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。

### 1.6.2 组织裂解：

匀浆后把匀浆液转移到离心管内，冰浴放置 15 分钟，间歇混匀或者 4 $^{\circ}$ C 旋转混匀 15 分钟。

### 1.6.3 提取组织细胞浆蛋白：

4 $^{\circ}$ C 16000 g 离心 5 分钟，取 80% 上清即为胞浆蛋白，保存备用。

注：吸取上清时千万不要触及沉淀，可以只取 80% 体积上清，以免胞浆蛋白中污染细胞核。

### 1.6.4 组织细胞核蛋白提取：

彻底去除步骤 1.6.3 中的上清，得到的沉淀按照步骤 1.5 进行。新鲜的肝脏组织用本产品裂解后获得的上清，其细胞浆蛋白浓度约为 1-5  $\mu$ g/ $\mu$ l，细胞核蛋白浓度约为 1-5  $\mu$ g/ $\mu$ l，不同状态的不同组织有所不同。

## 二. 关于胞浆蛋白和核蛋白产量和质量的评价：

### 2.1 蛋白产量：

组织	组织重量	胞浆蛋白	核蛋白
脑	~50 mg	~1.2 mg	~70 $\mu$ g
肝脏	~50 mg	~3.4 mg	~80 $\mu$ g
心脏	~50 mg	~1.6 mg	~140 $\mu$ g
肺	~50 mg	~1.5 mg	~70 $\mu$ g

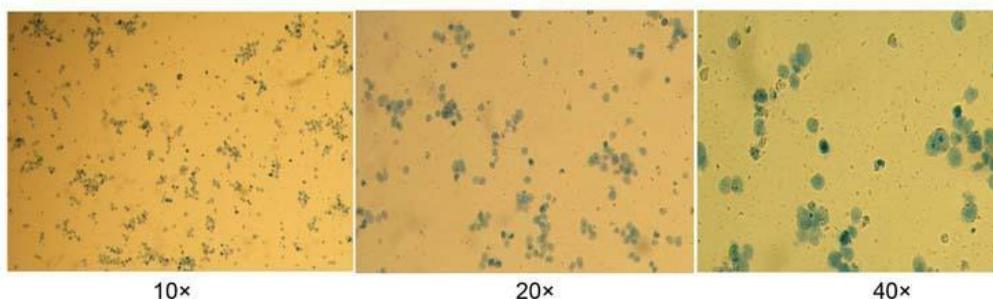
## 2.2 胞浆蛋白和核蛋白质量评价:

蛋白分区提取的质量评价首先看提取的蛋白是否是分区蛋白，其次要看分区蛋白是否有明显的富集，其三要看提出的分区蛋白是否有其他组分交叉污染，最后看提取的分区蛋白中是否可以检测出目的蛋白。使用专门的胞浆内参和细胞核内参（下表），可以初步确认提出的是胞浆蛋白还是核蛋白。蛋白是否有效富集需要用总蛋白作为对照，与总蛋白相比，胞浆蛋白内参或核内参是否有明显富集。交叉污染可以用其他组分内参检测蛋白样品，如关注胞浆蛋白中是否有细胞核蛋白污染，可以使用核蛋白内参如 **Lamin B1** 检测胞浆蛋白，检测无条带即说明胞浆蛋白与细胞核组分无交叉污染。用目标蛋白抗体检测分区蛋白，验证是否可以检测到目的蛋白，蛋白大小是否符合预期。

位置	内参名称	大小 kD	备注
胞浆蛋白内参	GAPDH	37	
	$\beta$ -Actin	45	
	<b><math>\beta</math>-Tubulin</b>	<b>55</b>	<b>推荐</b>
核内参	Histone H3	17	H3 出存在于细胞核内，也存在于线粒体中，胞浆中可以检测到
	PCNA	36	
	<b>Lamin B1</b>	<b>68</b>	<b>推荐</b>

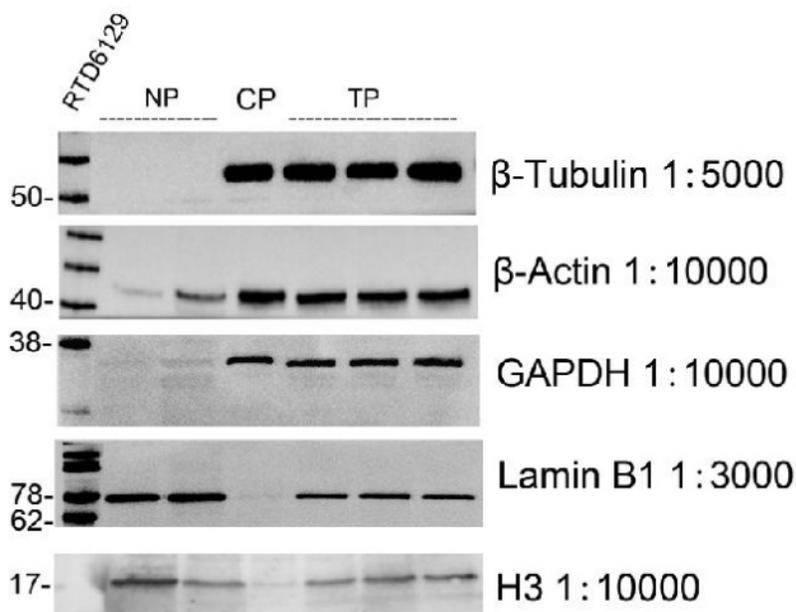
## 三. 实验示例:

### 3.1 K562 细胞台盼蓝染色:



K562细胞核台盼蓝染色

### 3.2 K562 细胞核浆分离 WB 检测:



K562细胞核浆蛋白分离内参选择

### Jurkat 总蛋白，细胞浆蛋白，细胞核蛋白 GAPDH 检测

**总蛋白提取：**  $4 \times 10^6$  K562 细胞，400 g 离心收集，去上清，沉淀中加入 200  $\mu$ l RIPA（加 2  $\mu$ l 100 mM PMSF），冰上裂解 5 分钟，4 $^{\circ}$ C 16000 g 15 分钟，上清即为总蛋白（TP）。

**细胞浆蛋白：**  $4 \times 10^6$  K562 细胞，400 g 离心收集，加入 400  $\mu$ l 细胞裂解缓冲液 A（加 4  $\mu$ l 100mM PMSF，加 0.4  $\mu$ l 1 M DTT），悬浮沉淀，冰浴 5 分钟；加入 20  $\mu$ l 细胞裂解缓冲液 B，混匀，冰上孵育 5 分钟，4 $^{\circ}$ C 16000g 5 分钟，小心收集上清即为细胞浆蛋白（CP），不要触及沉淀。

**细胞核蛋白提取：** 沉淀中计入 100  $\mu$ l 核蛋白提取试剂 I（变性），1  $\mu$ l Benzonase，37 $^{\circ}$ C 30 min，4  $^{\circ}$ C 16000 g 10 分钟，上清即为细胞核蛋白（NP）。

**电泳：** RTD6117-0420 200V 33-12 mA 55 min

**转膜：** NC 膜，1 $\times$ RealBlot 快速转膜液湿转，稳流 400 mA，电压变化 64-57 V，转膜时间 35 min

**封闭：** 无蛋白快速封闭液 RT 10 min

**一抗孵育；二抗孵育；检测：** ECL 发光检测