

**NoviPure™ Soil Protein Extraction kit****NoviPure™ 土壤蛋白提取试剂盒**

货号	提取次数
30000-20	20 次

简介

NoviPure™ Soil Protein Extraction Kit 专门设计用于提取广泛类型土壤微生物胞内、胞外总蛋白，腐殖质等干扰组分不会被提取。创新的双缓冲液提取法结合混搭研磨珠高效裂解细胞同时，溶解胞内、胞外蛋白质。沉淀后的总蛋白不含土壤杂质，比传统的提取方法更干净。最终蛋白沉淀加入合适缓冲液重悬后储存或进一步分析。所有试剂和塑料管均通过无蛋白、蛋白酶检验。

操作预览

加入 5g 土壤或沉积物到 50ml 研磨管中。再加入用户自备的二硫苏糖醇（DTT），短暂冰浴后珠磨研磨快速均质化。然后加入第二个溶液短暂冰浴，然后进行第二轮珠磨研磨。沉淀的总蛋白经过冲洗去除残余盐和去垢剂。根据下游应用所需加入合适量的缓冲液重悬蛋白。

相关产品	货号	提取次数
Vortex Genie® 2 Vortex	13111-V-220	1 unit (220V)
Vortex Adapter, holds 2(50ml) tubes	13000-V1-50	1 unit

设备要求

50ml Tube 管冷冻离心机（≤4500g）

冷冻微型离心机（20000g）

移液器（100 μl-1000 μl）

移液管（5ml-25ml）

Vortex-Genie® 2 Vortex（MOBIO 货号：13111-V-220）

50ml 涡旋仪适配器（MOBIO 货号：13000-V1-50）

冰桶

自备试剂

二硫苏糖醇（DTT）

三氯乙酸（TCA），预冷至 4℃

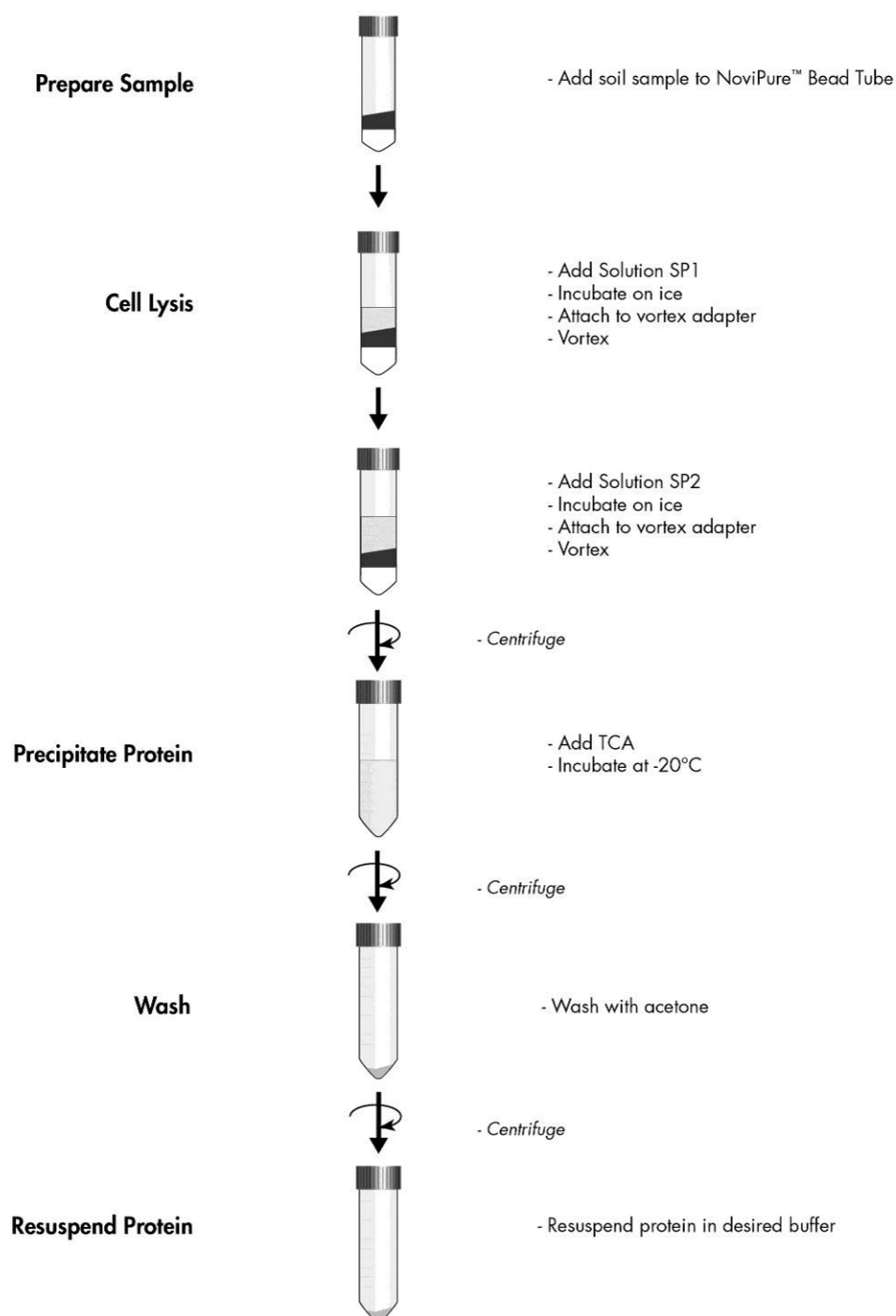
丙酮，HPLC 级，-20℃

试剂盒保存

试剂盒内试剂 4℃ 保存、使用。其它组分室温保存（15-30℃）



NoviPure™ Soil Protein Extraction Kit





试剂盒组分

货号: 30000-20	
组分	数量
NoviPure™ Bead Tubes	20 tubes
Solution SP1	315ml
Solution SP2	32ml
50ml Falcon™ Collection Tubes	40
1.7ml Low-Protein Binding Tube	20

实验开始前总要注意事项

实验开始前 4℃ 预冷 Solution SP1、SP2 和离心机。所有提取过程样品保持低温，以保护提取和沉淀过程中蛋白不被降解。

所有试剂使用前先摇匀。

HPLC 级丙酮须-20℃ 保存，冲洗步骤趁低温使用。

制备 1M 二硫苏糖醇 (DTT) 溶液 (4℃ 低温使用)

可用固体或 DTT 溶液。DTT 溶液暴露在空气中容易氧化。若使用的是 DTT 溶液，每次只制备少量。分装后-20℃ 保存。

加入 1.55g DTT 到双蒸水制备 10ml 1M DTT 保存液。分装后-20℃ 冷冻。每个样品需 150 μl 1M DTT。

若使用固体 DTT，加入 0.023g 到 Bead Tube 中。

制备 100% (W/V) 三氯乙酸 (4℃ 低温使用)

三氯乙酸 (TCA) 是种常用的蛋白沉淀试剂。

每 500g TCA 加入 227ml 超纯水或 HPLC 水，制备 100% (W/V) TCA。每提取 1ml 蛋白需 0.25ml TCA 用于沉淀。

TCA 溶液 4℃ 保存。

操作步骤

预冷并保持 Solution SP1 和 Solution SP2 于 4℃。HPLC 级丙酮须-20℃ 保存。TCA 须 4℃ 保存。预冷所有要用的 Tube 管。

1、加入 5g 土样到 50ml NoviPure™ Bead Tube (试剂盒提供) 中，并把 Tube 放入冰桶。

2、50ml NoviPure™ Bead Tube 仍放在冰桶中，加入 15ml 冷 Solution SP1。

深圳市安必胜科技有限公司 联系电话: 0755-8348 9872 传真: 0755-8348 9700

email: anbiosci@126.com QQ1: 854520684 QQ2: 1362545403



这一步发生了什么：Solution SP1 为一含去垢剂的温和缓冲液，它不会提取腐殖质。冰浴有助于维持溶液在合适 pH 值，保护蛋白不被降解，并提高蛋白回收率。

- 3、加入 **150 μ l 1M 二硫苏糖醇 (DTT)** 到 50ml NoviPure™ Bead Tube 中，使得 DTT 最终浓度为 10mM。见上文 DTT 制备。

注意：本操作说明专用于变性蛋白提取。

这一步发生了什么：DTT 是种二硫键还原剂。能切开二硫键，稳定蛋白中的硫醇基团。在蛋白提取过程中使用新鲜 DTT 灭活蛋白酶，保护蛋白。

- 4、涡旋至充分混匀，4℃冰浴 10min。

这一步发生了什么：珠磨研磨前加入 Solution SP1 孵育浸泡可建立低渗环境增强细胞机械裂解效果。

- 5、把 50ml NoviPure™ Bead Tube 安放在涡旋仪适配器上 (MOBIO 货号：13000-V1-50)，最大转速连续涡旋振荡 10min。

注意：若条件允许，请在室温较低的房间或冰箱内涡旋。

这一步发生了什么：研磨珠与微生物细胞、吸附在土壤组分中的胞外蛋白质相互碰撞，细胞裂解，蛋白溶解。

- 6、冷冻离心机设置在 4℃，4500g 快速离心 50ml NoviPure™ Bead Tube 30s。把 Bead Tube 和帽子上的土壤、研磨珠、缓冲液离下来。

这一步发生了什么：含有去垢剂的 Solution SP1 产生大量泡沫。在进行下一步前快速离心，把 Bead Tube 和帽子上的土壤、研磨珠、缓冲液离下来。

- 7、加入 1.5ml 冷 Solution SP2。

- 8、涡旋至充分混匀，4℃冰浴 10min。

这一步发生了什么：加入 Solution SP2 孵育，完全裂解微生物细胞，增加胞内、胞外蛋白质回收率。

- 9、摇匀样品，然后把 50ml NoviPure™ Bead Tube 安放在涡旋仪适配器上 (MOBIO 货号：13000-V1-50)，最大转速连续涡旋振荡 10min。

注意：若条件允许，请在室温较低的房间或冰箱内涡旋。

这一步发生了什么：第二次的珠磨研磨增强微生物细胞裂解，增加吸附在土壤组分上的胞外蛋白回收率。

- 10、冷冻离心机设置在 4℃，4500g 快速离心 50ml NoviPure™ Bead Tube 30s。

这一步发生了什么：提取的蛋白与土壤组分、研磨珠分离。

- 11、用移液器把上清转移到一个干净的 50ml Falcon™ Collection Tube(试剂盒提供)中。

注意：5g 土壤预期可获得 10ml 上清。

- 12、可选：若上清中仍带有土壤组分，冷冻离心机设置在 4℃，4500g 再离心一次。避开沉淀或任何悬浮碎片，转移上清到一个干净的 50ml Falcon™ Collection Tube(试剂盒提供)中。



这一步发生了什么：有时需要再次离心才能把土壤组分从蛋白上清中分离出去。再次离心可让下步获得更干净的蛋白沉淀。

- 13、每 1ml 蛋白上清加入 0.25ml 100% 三氯乙酸（TCA）。

注意：加入 TCA 后蛋白上清会呈云雾状。

这一步发生了什么：蛋白被从溶液中沉淀下来。加入 TCA 会让上清出现云雾状。残留的 Solution SP1 会被后续的丙酮冲洗掉。

- 14、稍微涡旋混匀，-20℃ 孵育 1h~过夜。

这一步发生了什么：建议至少沉淀 1h。高蛋白含量的样品在 1h 内就能完成沉淀。低蛋白含量的样品需要过夜孵育。

- 15、解冻此 50ml Falcon™ Collection Tube，上清化冻但仍保持冰冷。

这一步发生了什么：样品慢慢化冻，不能加热。可放在 4℃ 冰箱内 30min 化冻。

- 16、冷冻离心机设置在 4℃，4500g 离心 50ml NoviPure™ Bead Tube 20min。预冷 1.7ml Low-Protein Binding Tubes 和微型离心机到 4℃。确保 HPLC 级丙酮-20℃ 保存。

这一步发生了什么：蛋白、溶解的有机物、残余的 Solution SP1 都沉淀在 Tube 管底。

- 17、不扰动沉淀的情况下尽量吸掉上清。

注意：根据样品类型，有些沉淀会附着在管壁的一侧，有些不是。若沉淀发生位移，尽可能吸掉上清液，进入下一步。丙酮清洗步骤会去除残余缓冲液。

这一步发生了什么：蛋白在 Tube 管底的沉淀中，去掉上清好冲洗沉淀。

- 18、加入 1ml 冰冷的 HPLC 级丙酮，反复吹打、点振涡旋充分重悬沉淀。

注意：这一步尽可能保持样品处于低温，也要保持丙酮处于低温状态防止蛋白重新溶解和丢失的可能。

这一步发生了什么：冰冷的丙酮将溶解残余的 TCA 和 Solution SP1，但不溶解蛋白。残余的 TCA 和 Solution SP1 必须去除，以免干扰下游应用。

- 19、把丙酮重悬的蛋白液转移到一个新的 1.7ml Low-Protein Binding Tube 中（试剂盒提供）。

注意：若实验室条件没有冷冻微型离心机，可把样品转移到另一个 50ml Collection Tube 中（自备）。若使用的是另一个 50ml Collection Tube，用上面步骤同样的速度（4500g）离心，时间增加到 10min。

这一步发生了什么：转移重悬后的蛋白沉淀到一个更小的 Tube 管，有助于获得更紧实的沉淀，为后续冲洗步骤做准备。Low-Protein Binding Tubes 兼容质谱分析。

- 20、冷冻离心机设置在 4℃，20000g 离心 1.7ml Low-Protein Binding Tubes 5min。

这一步发生了什么：蛋白重新沉淀，残余 TCA 和 Solution SP1 被溶解。

- 21、小心倒掉丙酮。若沉淀出现位移，改用移液器。



22、再加入 1ml 冰冻丙酮冲洗沉淀，涡旋 10s，尽可能重悬沉淀。

注意：沉淀无需完全重悬。不要让样品离开冰桶太久。

这一步发生了什么：冲洗沉淀出去残余 TCA 和 Solution SP1。

23、冷冻离心机设置在 4℃， 20000g 离心 1.7ml Low-Protein Binding Tubes 5min。

24、小心倒掉丙酮。若沉淀出现位移，改用移液器。

25、重复冲洗步骤：再加入 1ml 冰冻丙酮冲洗沉淀，涡旋 10s，尽可能重悬沉淀。

注意：沉淀无需完全重悬。不要让样品离开冰桶太久。

这一步发生了什么：沉淀最后一次冲洗去除残余 TCA 和 Solution SP1。此时沉淀应比前面看起来更小更紧实。

26、冷冻离心机设置在 4℃， 20000g 离心 1.7ml Low-Protein Binding Tubes 5min。

27、小心吸掉丙酮。室温下在通风橱里或氮气干燥沉淀，直至沉淀不含水分但不至于形成结晶。

注意：此时需盯紧样品。土壤类型和沉淀颜色都会影响沉淀干燥速度。富含有机质土壤的蛋白沉淀颜色更深干燥需时更长。干燥时间为 5min-1h 不等。当沉淀已经干燥时，会从管壁脱离。若沉淀太过干燥，会非常难于重溶，但亦容易从 Tube 管松离。

注意：用于进一步分析利用前，干燥蛋白沉淀可-20℃保存。

这一步发生了什么：残留的丙酮被雾化，从蛋白沉淀中移除。沉淀不应留有丙酮残留，但也不能太过干燥，否则不易重溶。

28、根据下游需要加入 25 μ l-200 μ l 合适缓冲液重悬沉淀（如：加入 Laemmli 缓冲液或 Tris-HCl 缓冲液用于一维电泳；盐酸胍或尿素缓冲液用于 2D PAGE；胰蛋白酶消化做质谱分析）。

蛋白沉淀可能不易重悬。需剧烈反复吹打使蛋白重新溶解。

注意：特殊缓冲液配方见附录。

疑点难点

样品处理量

本试剂盒设计提取 5g 土样。对于大多数类型土样，增加加样量并不能增加得率。

角蛋白

角蛋白是一类纤维状蛋白质，构成头发、指甲、蹄、绒毛、羽毛和皮肤。土壤中含大量角蛋白，来源于哺乳动物、鸟类、爬行动物和某些昆虫。角蛋白分子量在 55-65kDa 之间，在 SD-PAGE 上能直接观察到。

质谱分析中角蛋白会掩盖掉稀有蛋白的行踪。蛋白提取纯化步骤常引入受角蛋白污染（(Parker et al. 1998.



ANBIOSCI TECH LTD

Electrophoresis 19:1920-32) 。

试剂盒所提供的试剂盒是 Tube 管出厂前均通过蛋白质检测，蛋白质、蛋白酶 $\leq 1\text{ng}$ 。

蛋白质浓缩

三氯乙酸（TCA）是种温和沉淀剂。建议用 TCA 沉淀蛋白后紧跟着丙酮冲洗。甲醇-氯仿浓缩法会丢失蛋白，不推荐使用。

蛋白定量

不同土样类型和提取过程中可溶性有机物的存在，用比色法（如：BCA、Bradford、Lowry's）定量检测蛋白可能会获得不准确的结果。

蛋白保存

在不同保存条件下蛋白溶液或冻干蛋白的稳定性高度决定于样品中蛋白质的种类。比如有些蛋白能 4°C 储存，而同一个样品中的另外一些蛋白却很容易降解，需要 -20°C 或 -80°C 保存。以下为针对混合蛋白样品的建议：

短时间保存， 4°C 不超过一个月。建议加入叠氮化钠（ NaN_3 ）至最终浓度 0.02-0.05%，防止细菌生长。

长期保存，蛋白溶液或冻干粉保存数量：分装成小份， -20°C 、 -80°C 冷冻，或液氮保存。

质谱分析

NoviPure™ Soil Extraction Kit 提取的蛋白适合用于质谱分析，实验结果证明 1D、2D LC-MS/MS 获得极佳结果。1D LC-MS/MS 需酶解后用 Strong Cation Exchange（SCX）柱子去除去垢剂。蛋白样品跑 2D LC-MS/MS，去垢剂已有效去除，不用额外处理。



附录：缓冲液配方

50mM Tris-HCl (pH6.8- 8.5)

加入 6.1g Tris 或 Trizma 到 900ml HPLC 级或超纯水中。
用浓盐酸调整到所需 pH。定容到 1L。

50mM Tris-CaCl₂ (pH 7.6)

加入 6.1g Tris 或 Trizma、1.11g CaCl₂ 到 900ml HPLC 级或超纯水中。用浓盐酸调整 pH 到 7.6。定容到 1L。

25mM 碳酸氢铵

加入 1.98g 碳酸氢铵到 HPLC 级或超纯水中，定容到 1L。

2X Laemmli 缓冲液 混合以下试剂：

0.5M Tris-HCl, pH6.8 2.5ml

丙三醇 2ml

10% (W/V) SDS 1g

0.1% (W/V) 溴酚蓝 0.01g

用 HPLC 级或超纯水定容到 10ml。加入每需要 1ml 缓冲液加入 50 μ l 新鲜 β Me。用样品或水以 1: 1 稀释。

6M 盐酸胍缓冲液

加入 573.18g 盐酸胍和 1.5g 二硫苏糖醇 (DTT) 到 420ml pH7.6 50mM Tris-CaCl₂。混匀溶解，用 pH 7.6 50mM Tris-CaCl₂ 定容到 1L。

6M 尿素缓冲液

加入 4g 尿素 (6M) 到 10ml 25mM 碳酸氢铵溶液。

二维电泳重悬缓冲液 混合一下试剂：

7M 尿素 42.42g

2M 硫脲 152.24g

2% CHAPS (W/V) 20g

2% Nonidet P-40 20ml

0.002% 溴酚蓝 (W/V) 20mg

0.5% 两性电解质 5ml

100mM 1,4-二硫赤藓糖醇 (DTE) 15.43g

用 HPLC 级或超纯水定容到 1L。



ANBIOSCI TECH LTD

推荐产品

更全的产品介绍，请查看 www.anbiosci.com

名称	货号	提取次数
PowerSoil® DNA Isolation Kit	12888-50	50 次
	12888-100	100 次
RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit	12866-25	25 次
RNA PowerSoil® DNA Elution Accessory Kit	12867-25	25 次
PowerMax® Soil DNA Isolation Kit	12988-10	10 次
PowerLyzer™ PowerSoil® DNA Isolation Kit	12855-50	50 次
	12855-100	100 次
PowerSoil®-htp 96 Well Soil DNA Isolation Kit	12955-4	4×96 次
	12955-12	12×96 次
PowerMag® Soil DNA Isolation Kit (Optimized for KingFisher®)	27000-4-KF	4×96 次
PowerMag® Soil DNA Isolation Kit (Optimized for epMotion®)	27100-4-EP	4×96 次

更多实用技巧请参阅 <http://www.anbiosci.com/MBweibo/blog.htm>