



细胞核蛋白质提取试剂盒说明书（简化版）

（W037-1-1 Nucleoprotein Extraction Kit）

一、产品简介：

本试剂盒提供独特的组份，采用特殊的非离子型去污剂，以及焦磷酸钠等数种蛋白磷酸酶和蛋白酶抑制试剂。能够在非变性和低渗的条件下裂解细胞，经过洗涤去除大部分胞质蛋白和膜蛋白，释放的细胞核能够保持完整，再用 Lysis Buffer 对细胞核蛋白质进行抽提的同时可以保持核蛋白质的活性，因此该产品可适合用于 SDS-PAGE 电泳、Western Blot、免疫共沉淀、EMSA、Pull Down 和转录调控等后续蛋白质或分子生物学相关实验的研究，每次可以从 10^7 个培养细胞或 200mg 动物组织提取核蛋白质，本试剂盒可以使用 50 次。

二、产品特点：

- 1、提取的核蛋白质可以最大限度的保持蛋白活性，可以用于 EMSA，转录因子分析实验。
- 2、可以从 50×10^7 个培养细胞或 $50 \times 200\text{mg}$ 动物组织提取核蛋白。
- 3、整个实验过程只需要 45 分钟左右。
- 4、在提取的过程中，最大限度的减少了膜和胞质蛋白对核蛋白的污染。
- 5、不需要超速度离心，可以同时处理多个样品。

三、运输和保存条件：

常温下运输，在收到后，将磷酸酶抑制剂，PMSF 和 DTT 在 -20°C 的环境中保存，其余 $2-8^\circ\text{C}$ ，保质期一年。

四、产品组成（50T）：

成分	剂量
Lysis Buffer	10ml
Hypotonic Buffer	50ml
磷酸酶抑制剂	300 μl
PMSF	600 μl
DTT	60 μl



五、操作步骤：

A、实体组织蛋白的提取

- 1、在每 1ml 冷 Hypotonic Buffer 加入 5 μ l 磷酸酶抑制剂，10 μ l PMSF 和 1 μ l DTT 混匀。冰上保存数分钟待用。
- 2、将 100-200mg 固体组织置于培养皿中，手术剪将小块充分剪碎，尽量去除脂肪组织和结缔组织等非目的组织，用 PBS 洗涤两次，离心，取沉淀后加入 0.6ml 冷 Hypotonic Buffer 混匀，4℃ 下玻璃匀浆器上下手动匀浆 30-50 次。或超声破碎细胞，每次 30sec，3~4 次，每次间隔 1min，置于冰上冷却。均质匀浆或超声破碎细胞后应镜检，细胞破碎率不小于 90%，同时没有明显的组织小块。
- 3、转移到 1.5ml 预冷的离心管，手指弹管壁使沉淀悬起，冰浴 10min，震荡 10 秒钟，混匀。
- 4、在 4℃，800g（3000rpm）离心 5min，立即弃上清，再加 0.4ml 冷 Hypotonic Buffer 震荡洗涤沉淀 30sec，再 4℃，2500g（5000rpm）离心 5min，弃掉上清。
- 5、在沉淀中加 0.2ml Lysis Buffer（每 1ml Lysis Buffer 冷加入 5 μ l 磷酸酶抑制剂，10 μ l PMSF 和 1 μ l DTT）震荡将沉淀悬起，冰浴 20 分钟，再 4℃ 15000rpm（20000g）离心 10 分钟，弃沉淀。上清为核提取物，分装后-70℃ 保存。

B、培养细胞蛋白提取

- 1、贴壁培养的细胞，吸去培养基后，加入 10ml/150mm 培养板的冷 PBS 洗两次，每次振荡数次以尽量去除培养液。
- 2、悬浮培养的细胞或用细胞刮子刮下的贴壁细胞，将细胞及培养液移至离心管中，4℃，800g（3000rpm）离心 10min，再用 10ml/150mm 培养板的冷 PBS，800g（3000rpm）离心 5min 洗两次。
- 3、在每 1ml 冷 Hypotonic Buffer 加入 5 μ l 磷酸酶抑制剂和 10 μ l PMSF 和 1 μ l DTT，混匀。冰上保存数分钟待用。
- 4、在上述培养板或离心管的细胞中，加入上述配制好的冷 Hypotonic Buffer，加入量如下表所示：

细胞数量	培养瓶或培养板的规格	Hypotonic Buffer 加入量
5 $\times$ 10 ⁶ 个	60mm 培养板或 75cm ² 培养瓶	0.30ml-0.45ml
1 $\times$ 10 ⁷ 个	100mm 培养板或 150cm ² 培养瓶	0.60ml-0.90ml

- 5、冷室或冰上操作，贴壁细胞用细胞刮子刮下，连 Hypotonic Buffer 一同转移至新的预冷的离心管中。悬浮培养或裂解前刮下的贴壁细胞连 Hypotonic Buffer 一同转移至新的预冷的离心管中。
- 6、手指弹管壁使沉淀悬起，冰浴 10 分钟，震荡 10sec，混匀。
- 7、以下步骤同实体组织蛋白的提取中的 A4-5 步骤。