



细胞核/浆蛋白提取试剂盒说明书（简化版）

（W038-1-1）

【产品简介】

在细胞生物学研究过程中经常要研究细胞的不同组份，而研究最多的两个细胞组份就是细胞核和细胞浆。分离细胞核蛋白和细胞浆蛋白，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核蛋白可以用于转录调控方面的研究，例如 EMSA(也称 gel shift)、footprinting、免疫共沉淀、Western Blot、报告基因检测以及酶活性测定等后续蛋白质研究等。

细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒(Nuclear and Cytoplasmic Protein Extraction Kit)提供了一种比较简单、方便的从培养细胞或新鲜组织中抽提细胞核蛋白与细胞浆蛋白的方法。约 90 分钟即可完成培养细胞的细胞核蛋白与细胞浆蛋白的分离。

本试剂盒是通过细胞浆蛋白抽提试剂A和B，在低渗透压条件下，使细胞充分膨胀，然后破坏细胞膜，释放出细胞浆蛋白，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。

【试剂盒组成】

组成 \ 规格	50T	储存温度
溶液 A	25 ml	4℃
溶液 B	1.5 ml	4℃
溶液 C	12.5 ml	4℃
DTT	50μl	-20℃
蛋白酶抑制剂	50μl	-20℃
PMSF (100mM)	500μl	-20℃

【自备仪器及试剂】

低温高速离心机、微量移液器、玻璃匀浆器（组织）、1.5ml离心管、涡旋振荡器、相差显微镜、PBS

【运输和保存条件】

在常温下运输，收到后，请将蛋白酶抑制剂、PMSF（100mM）、DTT 置于-20℃的环境中保存，其余试剂4℃保存，保质期为一年。



【操作步骤】

1、样本处理：

A、细胞样本：

- ①、悬浮细胞可直接离心（2000rpm，5min）收集细胞；
- ②、贴壁细胞需要消化或机械刮下收集细胞。用PBS洗涤一次细胞并计数，离心（2000rpm，5min）收集细胞，吸尽上清后，并估计细胞沉淀的体积（PCV）。每次提取需要 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个细胞。通常每 1×10^7 个细胞的沉淀体积约100 μ l。
- ③、转入第3步进行操作。

B、组织样本：

- ①、称取100~500 mg新鲜组织如肝脏等，PBS冲洗，用剪刀剪成碎块放入小容量玻璃匀浆器内。
- ②、加入适量的冰冷PBS匀浆后，静置5 min，弃沉淀，小心吸取上清转移至另一离心管中。
- ③、上清4 $^{\circ}$ C离心（2000rpm，5 min），弃上清，估计细胞沉淀的体积（PCV）
- ④、转入第3步进行操作。

2、工作液的准备：

溶液A工作液：每ml溶液A加入1 μ l DTT，5 μ l 100mM PMSF，1 μ l蛋白酶抑制剂。

溶液C工作液：每ml溶液C加入1 μ l DTT，5 μ l 100mM PMSF，1 μ l蛋白酶抑制剂。

- 3、在第1步中获得的细胞沉淀每20 μ l细胞沉淀的体积，加入200 μ l预冷的溶液A工作液，最大转速涡旋剧烈振荡10s，把细胞沉淀完全悬浮并分散开（如果细胞沉淀没有完全悬浮并分散开，可以适当延长震荡时间）。
- 4、放置冰上10~15min。
- 5、加入11 μ l冷溶液B，最大转速涡旋剧烈振荡5s，放置冰上1min。
- 6、再次最大转速涡旋剧烈振荡5s后，4 $^{\circ}$ C离心（13000rpm，5min）。
- 7、立即吸取上清至一预冷的塑料管中，即为抽提得到的细胞浆蛋白。可以立即使用，也可以冻存。（千万不要触及沉淀，可以在沉淀上方保留极小体积的上清，以免触及沉淀。）
- 8、对于沉淀，完全吸尽残余的上清。在离心沉淀物（细胞核）中加入100 μ l预冷的溶液C工作液，最大转速涡旋剧烈振荡15s，放置冰上30min，每间隔3min涡旋剧烈振荡15seconds。
- 9、4 $^{\circ}$ C离心（13000rpm，10min），尽快将上清转入一预冷的洁净微量离心管，即得核蛋白。
- 10、上述提取的胞浆蛋白和核蛋白进行蛋白定量（建议用BCA法），分装并保存于-80 $^{\circ}$ C，避免反复冻融。