

细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒使用说明书

【包装规格】

产品编号	产品名称	包装
EK-6100	细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒	50T/100T
EK-6100A	Cytoplasmic Extract Buffer I (CE I)	15ml/30ml
EK-6100B	Cytoplasmic Extract Buffer II (CE II)	0.5ml/1ml
EK-6100C	Nuclear Extract Buffer (NE)	3ml/6ml
	使用说明书	1 份

【保存条件】

-20℃ 保存，有效期 1 年

【使用建议（仅供参考）】

1. **准备溶液：**室温融解试剂盒中的三种试剂，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 CE I/II 及细胞核蛋白抽提试剂 NE 备用，在使用前数分钟内加入蛋白酶抑制剂混合物及 PMSF，使 PMSF 的最终浓度为 1mM（现配现用）。

A: **对于贴壁细胞：**用 PBS 洗一遍，用细胞刮子刮下细胞，或用 EDTA 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。离心收集细胞，尽最大努力吸尽上清，留下细胞沉淀备用。（注：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。）

B: **对于悬浮细胞：**用预冷的 PBS 清洗一遍，离心收集细胞，尽最大努力吸尽上清，留下细胞沉淀备用。

2. 每 20 μ L 细胞沉淀加入 200 μ L 添加了 PMSF 和蛋白酶抑制剂的细胞浆蛋白抽提试剂 CE I。（对于 200 万 HeLa 细胞，其细胞沉淀的体积大约为 20 μ L 或 40mg。）

3. 最高速剧烈涡旋 5-10 秒，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，可以适当延长涡旋时间。）

4. 冰浴 10-15 分钟。（过程中可适当涡旋 2-3 次）

5. 加入细胞浆蛋白抽提试剂 CE II 10 μ L。最高速剧烈涡旋 5 秒，冰浴 1 分钟。

6. 4℃ 下 12,000-16,000g 转速离心 5 分钟。

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。每 200

万细胞用 200 μ L 本产品中的细胞浆蛋白抽提试剂 CE I 裂解后可获得的上清, 其细胞浆蛋白浓度约为 2-5mg/ml, 不同细胞有所不同。)

8. 对于沉淀, 完全吸尽残余的上清后, 加入 50 μ L 添加了 PMSF 的细胞核蛋白抽提试剂 NE。(不吸尽上清会带来细胞浆蛋白的污染。若无法吸尽可使用 PBS 重悬高速离心后再吸弃上清进行裂解操作。)

9. 将沉淀重悬并在冰上孵育 10 分钟 (过程中可适当涡旋 3-5 次)。

10. 4 $^{\circ}$ C 下 12,000-16,000g 转速离心 10 分钟。

12. 立即吸取上清至一预冷的塑料管中, 即为抽提得到的细胞核蛋白。可以立即使用, 也可以-80 $^{\circ}$ C 冻存。每 200 万细胞用 50 μ L 本产品中的细胞核蛋白抽提试剂裂解后获得的上清, 其细胞核蛋白浓度约为 1.2-3.0mg/ml, 不同细胞有所不同。

另: 新鲜组织细胞核与细胞质蛋白提取

① 把组织尽可能切成非常细小的碎片。按照 20:1 的比例混合适当量的细胞浆蛋白抽提试剂 CE I 和 CE II(例如 200 μ L 细胞浆蛋白抽提试剂 CE I 中加入 10 μ L 抽提试剂 CEII)。并加入 PMSF 至最终浓度为 1mM 配制成组织匀浆液。按照每 60mg 组织加入 200 μ L 组织匀浆液的比例混合组织和组织匀浆液(对于不超过 30mg 的组织样品, 仅需加入 100 μ L 组织匀浆液), 并在玻璃匀浆器内充分匀浆。匀浆需在冰浴或 4 $^{\circ}$ C 进行。

② 匀浆后把匀浆液转移到塑料离心管内, 冰浴放置 15 分钟。

③ 4 $^{\circ}$ C 条件下 1,500g 离心 5 分钟。把上清转移至一预冷的塑料管中, 为抽提得到的部分细胞浆蛋白。(吸上清时千万不要触及沉淀。)

④ 对于沉淀, 到了这一步已经充分匀浆, 但很多细胞还没有破碎。接下去按照上一个细胞核质蛋白使用说明书的步骤 3 开始操作, 即把沉淀当做已经离心收集好的细胞沉淀操作, 按照步骤 3 至步骤 12 抽提得到细胞浆蛋白和细胞核蛋白(特别说明:对于起始量为 30-60mg 的组织样品, 后续直接按照步骤 3-12 操作即可;对于起始量不超过 30mg 的组织样品, 后续步骤 3-12 中的溶液的用量须减半使用)。抽提得到的细胞浆蛋白可以和步骤 13 中抽提得到的细胞浆蛋白合并。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 3-10mg/ml, 细胞核蛋白浓度约为 3-10mg/ml, 不同状态的不同组织有所不同。

【注意事项】

1. PMSF 及蛋白酶抑制剂现配现用, 配好后不能长时间储存。
2. 尽量减少反复冻融的次数, 以免效率下降。