

细胞核蛋白/浆蛋白提取实验

(1) 将核浆分离试剂盒各组分置于冰上解冻，并在试剂 A 和试剂 C 中加入 1×蛋白酶抑制剂，离心机预冷至 4 °C。弃掉培养皿中的培养基，加入 PBS 缓冲液清洗 1 次，为了避免胰酶消化破坏细胞膜完整性影响分离效果，使用细胞刮刀机械刮下细胞，收集于离心管中， $300\times g$ 离心 5 min，弃上清。用 PBS 重悬并计数，取 2×10^6 个细胞置于 1.5 mL 离心管中， $300\times g$ 离心 5 min，吸弃上清，收集细胞沉淀。

(2) 向细胞沉淀中加入 200 μL 试剂 A，重悬混匀后冰上静置 10 min，促进细胞膜裂解。随后加入 10 μL 试剂 B（胞浆蛋白抽提辅助剂），最高速涡旋振荡 5 s，冰上静置 1 min；再次最高速涡旋振荡 5 s，冰上静置 2 min。将混合液置于 4 °C 离心机， $1600\times g$ 离心 10 min，小心吸取上清液转移至新管中（即为胞浆蛋白），注意保留沉淀上方极微量上清以防吸入沉淀造成核组分污染，样品置于 -80 °C 保存。

(3) 向步骤 (2) 中残留的沉淀中加入 200 μL 试剂 A 重悬，充分混匀后立即在 4 °C 条件下以 $13000\times g$ 离心 5 min。弃尽上清液，此时需使用 10 μL 小量程吸头尽可能吸干残留液体，以最大限度去除胞浆蛋白残留，注意操作时切勿触及沉淀。

(4) 向清洗后的沉淀中加入 100 μL 试剂 C（核蛋白裂解液），充分混匀后最高速涡旋振荡 10 s。将离心管置于冰上裂解 10 min，期间每隔 2 min 取出进行剧烈涡旋振荡 1 次，以确保细胞核充分裂解释放蛋白。

(5) 将裂解结束的悬液置于 4 °C 离心机， $13000\times g$ 离心 10 min，将含有可溶性细胞核蛋白的上清液转移至新离心管中。立即使用 BCA 法测定蛋白浓度，根据浓度加入适量 Loading Buffer 煮沸变性，或分装后置于 -80 °C 冰箱

长期保存。