

细胞核蛋白与细胞浆蛋白提取试剂盒使用说明书

【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提取试剂盒	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 12 个月

【概述】

本试剂盒利用分步裂解法，通过优化不同缓冲液的离子强度和去污剂浓度，先破坏细胞质膜释放胞浆蛋白，再通过离心收集完整的细胞核，最后裂解细胞核释放核蛋白。提取的蛋白保持天然活性，可用于 Western Blot、EMSA、转录因子活性分析等下游实验。

【实验准备】

- 试剂准备：**将 CE I、CE II 和 NE 溶液置于冰上融解，使用前混匀。
- 抑制剂添加：**使用前数分钟内，向所需体积的抽提液中加入蛋白酶抑制剂。
按推荐比例加入相应的蛋白酶或蛋白酶/磷酸酶抑制剂混合物（如 ES-8315 蛋白酶抑制剂混合物 Cocktail(通用型, 100×) 或 ES-8317 蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(All-in-one, 50×)，现配现用）。
- 样本起始量及预处理：**

贴壁细胞：2×10⁶ 细胞（约 20 μL 细胞沉淀体积）。用预冷 PBS 洗一遍，用细胞刮刀刮下细胞，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。500×g 离心 5 分钟收集细胞，尽最大努力吸尽上清，留下细胞沉淀备用。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。

悬浮细胞：2×10⁶ 细胞（约 20 μL 细胞沉淀体积）。4℃ 条件下以 500×g 离心 5 分钟收集细胞，期间使用预冷 PBS 洗涤一次。

组织：约 30-60mg 组织。首选新鲜采集的组织；如果是冻存组织，必须从-80℃ 直接取出后迅速切碎，严禁室温自然解冻（解冻过程中产生的冰晶会刺破溶酶体造成蛋白降解）。

【操作步骤】

第一阶段：样本前处理

A. 培养细胞（贴壁/悬浮）	B. 组织样本
<p>(1) 收集: 离心收集细胞（约 2×10^6 细胞），用预冷 PBS 洗涤 1 次。</p> <p>(2) 除液: 彻底吸干上清，留下细胞沉淀备用。</p> <p>(3) 下接: 直接进入第二阶段步骤 2。</p>	<p>(1) 剪碎: 将组织尽可能剪碎成微小碎片。</p> <p>(2) 配液: 按 20:1 比例预混 CE I 与 CE II，配制成“组织匀浆液”。</p> <p>(3) 匀浆: 按每 60 mg 组织加入 200 μL 组织匀浆液的比例，使用玻璃匀浆器在冰上充分匀浆（选择机械匀浆仪更优。若使用组织 30mg 则使用量减半，下述实验步骤亦减半试剂用量）。</p> <p>(4) 粗提: 将匀浆液转至离心管，冰浴 15 分钟。随后 4°C，$1,500 \times g$ 离心 5 分钟。</p> <p>(5) 下接: 吸取上清（含部分胞浆蛋白）暂存；将沉淀接第二阶段步骤 2 操作。</p>

第二阶段：胞浆蛋白提取

- 重悬:** 向上一步骤细胞沉淀中加入 200 μ L CE I（含抑制剂）。
- 分散:** 最高速剧烈涡旋 5-10 秒，使细胞完全悬浮分散。
- 冰浴孵育:** 置于冰上孵育 10-15 分钟，期间可涡旋 2-3 次。
- 胞浆促裂:** 加入 10 μ L CE II，最高速剧烈涡旋 5-10 秒。若沉淀未完全分散，可适当延长涡旋时间。
- 冰浴平衡:** 冰浴 1 分钟。
- 离心:** 4°C 下， $12,000 \times g$ 离心 5 分钟。
- 收集胞浆蛋白:** 立即吸取上清至预冷管中，即为细胞浆蛋白。

第三阶段：核蛋白提取

- 沉淀洗涤（可选）:** 为防止胞浆蛋白污染，请彻底吸干余液。若沉淀较粘稠或对纯度要求极高，可用 200 μ L PBS 重悬后再次离心弃上清。
- 核裂解:** 向沉淀中加入 50 μ L NE（含抑制剂）。
- 释放:** 剧烈涡旋重悬沉淀，冰上孵育 10 分钟。**注意：期间每隔 2 分钟需剧烈涡旋 5 秒，以助核蛋白充分释放。**
- 收集核蛋白:** 4°C 下， $12,000-16,000 \times g$ 离心 10 分钟。收集上清即为细胞核蛋白。

【注意事项】

- 全程低温:** 全过程（包括离心、匀浆、涡旋间隙）必须在 4°C 或冰上进行，预冷离心管和离心机是实验成功的保障。
- 交叉污染防控:** 吸取胞浆蛋白时切勿触及核沉淀；提取核蛋白前务必吸净残余胞浆液。
- 配制建议:** 抑制剂添加后的 CE I 和 NE 必须现配现用。严禁将添加了抑制剂的提取液长期储存，以免抑制剂失效影响实验结果。
- 得率参考:** 每 2×10^6 细胞约得胞浆蛋白 2-5mg/mL，核蛋白 1.2-3.0mg/mL。新鲜肝脏组织约得细胞浆蛋白 3-10mg/mL，核蛋白 3-10mg/mL，结果随样本种类和状态有所波动。
- DNA 拖尾处理:** 若核蛋白电泳拖尾，说明 DNA 含量过高。可在步骤 11 结束后进行短时间超声处理（如 30W, 3s）以剪切 DNA。
- 匀浆标准化:** 坚韧组织若匀浆不彻底，细胞核会包裹在组织碎屑中导致得率下降。建议使用机械匀浆。