

细胞/组织核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-6105	细胞核蛋白提取试剂盒	50T/100T
EK-6105A	10×裂解缓冲液LBH	5mL/10mL
EK-6105B	裂解缓冲液CA	2mL/4mL
EK-6105C	提取缓冲液EXB	5mL/10mL
	使用说明书	1份

【保存条件】

4°C保存 3 个月，-20°C保存一年

【实验前准备】

- 1×裂解缓冲液 LBH 稀释：**取 1mL 的 10×裂解缓冲液 LBH 加入 9mL 去离子水，混匀。
- 抑制剂添加（关键）：**临用前，向所需体积的 1×LBH 和 EXB 中加入蛋白酶抑制剂（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）。
- 设备预冷：**提前开启冷冻离心机至 4°C。

【操作步骤】

A.培养细胞核蛋白提取：

1. 细胞收集（起始量：约 10^6 – 10^7 个细胞）：

贴壁细胞：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：4°C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。

2. 细胞溶胀（去胞浆）：将收集的细胞中加入 500μL 1×裂解缓冲液 LBH（含抑制剂）并在冰上孵育 15 分钟，让细胞膨胀破裂。

3. 促裂：加入 30μL 裂解缓冲液 CA，立即剧烈涡旋 10 秒，使细胞膜彻底破碎释放胞浆。

4. 沉降细胞核：在 4°C下以 10,000–12,000×g 立即离心 1 分钟。

5. 核洗涤（可选，提高纯度）：向核沉淀中加入 500 μL 冰冷 PBS，轻轻颠倒混匀，4°C下

10,000–12,000×g 离心 1 分钟，弃上清。

注：此步骤能显著减少核蛋白中的胞浆残留（如 GAPDH 污染）。

6. 核蛋白抽提：向核沉淀中加入 50 μL 提取液缓冲液 EXB（含抑制剂）。冰上孵育 30 分钟。期间每隔 10 分钟剧烈涡旋 10 秒，辅助核蛋白从染色质上脱落。

7. 收集：在 4°C 下以 14000×g 离心 30 分钟，收集上清即为细胞核蛋白。

B. 组织中提取核蛋白（起始量：约 100mg）：

1. 切碎洗涤：取 100mg 组织，PBS 洗涤 2 次除去血污，剪成碎糜状。

2. 匀浆裂解：加入 1,000 μL 1×LBH（含抑制剂），置于预冷的匀浆器中冰浴匀浆。低温匀浆组织直到>90%的细胞破碎，可取一部分于显微镜下观察判断。

3. 沉降细胞核：4°C 下，12,000×g 离心 20 分钟。

4. 弃胞浆：丢弃上清液。

5. 核洗涤（建议）：加入 1mL 冰冷 PBS 重悬核沉淀，再次以 11,000×g 离心 5 分钟，弃上清，吸干余液。

注：组织样本碎片多，洗涤步骤对纯度至关重要。

6. 核蛋白抽提：向粗核沉淀中加入 50 μL 提取液 EXB（含抑制剂）。在冰上放置 30 分钟裂解，期间每隔 10 分钟剧烈涡旋 10 秒。

7. 收集蛋白：在 4°C 下以 14000×g 离心 30 分钟，收集上清即为细胞核蛋白。

【注意事项】

1. 内参选择：如果您后续要做 Western Blot 验证，核蛋白内参建议选择 Histone H3、Lamin A/C 或 PCNA。

2. 交叉污染防控：吸除上清时切勿触及核沉淀；提取核蛋白前务必彻底吸净残余液体，防止胞浆蛋白残留。

3. 全程低温：所有步骤（包括离心、匀浆、涡旋间隙）必须在 4°C 或冰上进行。

4. 保存建议：提取得到蛋白样本建议小量分装后置于 -80°C 保存，避免反复冻融。

5. 小量样本：组织量若很少，可使用 50mg，所有试剂按比例减半使用。

6. 粘稠度处理：若提取液极其粘稠（DNA 释放过多），可适当增加步骤 6 中的涡旋频率或进行短时间超声处理（如 30W, 3s）。

7. 安全防护：请穿实验服并戴一次性手套操作。