

细胞核蛋白提取试剂盒

KP311 100次

试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	KP311
Buffer A	-20°C	100ml
buffer B	-20°C	100ml
固定液 A	-20°C	5ml

本试剂盒在所需温度储存 12 个月不影响使用效果。

产品介绍:

在破碎组织细胞时加入活化剂, 帮助裂解细胞, 反复振荡或使用剪切力释放细胞核, 然后在温和条件下低速离心收集细胞核。在 30-60 分钟内完成, 无需特殊设备, 简便易行, 重复性好。适用于从组织块、贴壁或悬浮培养细胞制备完整高纯度细胞核。制备的细胞核仍然保持其在细胞内时所具有的形状和大小, 是进行细胞核相关实验、研究蛋白核转位、DNA-蛋白相互作用、以及进行 WB 和免疫共沉淀的理想材料。

操作步骤:

1. 培养细胞裂解
 - a. 贴壁细胞需消化或刮下细胞, 悬浮细胞可直接离心, PBS 洗涤, $800 \times g$ 5 min 收集细胞。计数, 并估计细胞沉淀的体积。每次提取需要 $1-2 \times 10^7$ 个细胞。通常每 1×10^7 个细胞的沉淀体积约 100 μ l。
 - b. 加入 10 倍于细胞沉淀体积的 1 ml 冰预冷的 Buffer A, 振荡重悬细胞。冰水浴 5 分钟。
 - c. 加入 1/20 体积约 50 μ l 固定液 A, 剧烈振荡混合。冰水浴 5 分钟。再次剧烈振荡。
 - d. 将细胞裂解物 3 次或多次通过 22 号针头剪切, 或用小容积间隙紧密的玻璃匀浆器上下研磨 20 次。在相差显微镜下检查游离的核应达到 95%而未裂解细胞应少于 5%。否则继续剪切或研磨。
2. 组织块破碎和裂解

- a. 称取 100-200 mg 新鲜组织如肝脏、脑, PBS 冲洗, 加入 1 ml (约 10 倍组织体积) 冰预冷的 Buffer A。
- b. 用间隙严密的研杵上下研磨培养上下研磨组织 10 次。冰水浴 5 分钟。
- c. 加入 1/20 体积约 50 μ l 固定液 A, 混合。冰水浴 5 分钟。剧烈振荡。
- d. 在相差显微镜下检查游离的核应达到 95% 而未裂解细胞应少于 5%, 否则继续剪切或研磨。
- e. 如有必要, 用滤纸过滤组织匀浆裂解物。

3. 细胞核制备

- a. 将组织或细胞匀浆物转移到离心管。1000 \times g 离心 3 min 4 $^{\circ}$ C 沉淀细胞核, 弃上清。
- b. 用 10 倍于胞核体积(约 0.5 ml) Buffer B 重悬核。4 $^{\circ}$ C 2000 \times g 离心 10 min, 弃上清。
- c. 重复步骤 B 洗涤细胞核。在相差显微镜下胞核正常应游离分散, 在清亮背景下存在颗粒物表明细胞质成分残留; 核聚集表明存在粘连性的细胞骨架或染色质, 通常由于细胞匀浆破碎不足或起始细胞数太多所致。
- d. 弃上清, 用 50-100 μ l 适宜的缓冲液 (见注意 3) 重悬细胞核, 进行下一步实验, 或将胞核沉淀直接-70 $^{\circ}$ C 保存, 注意解冻后会有部分核在融化过程中破裂。

注意:

- a. 破碎细胞是关键环节。与组织块相比, 培养细胞特别是贴壁细胞较难破壁。组织细胞裂解物 3 次或多次通过 22 号针头剪切破碎细胞, 或用小容积玻璃匀浆器、间隙紧密的研杵上下研磨培养 20 次。用相差显微镜检查未裂解细胞应少于 5%。否则继续剪切或研磨。
- b. 基于梯度密度离心原理, 以离心力 g 计算正确的离心速度十分重要。
- c. 加入何种缓冲液重悬细胞核, 取决于用户后续的实验。如做 WB 可用 RIPA 裂解缓冲液。
- d. 进行 Western Blot 和 2D-胶电泳, 可先用小体积的水重悬核沉淀, 然后加入样品缓冲液, 如果直接用含 SDS 的缓冲液裂解核将释放大量粘稠的 DNA 使样品难以分散。反复加热变性有助于 DNA 断裂, 可通过细针头反复抽吸打断 DNA。
- e. 免疫沉淀时可直接加入 IP 缓冲液。